

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



**EFEECTO CITOPROTECTOR DEL TACRÓLIMUS EN UN
MODELO DE SEPSIS DE ORIGEN PERITONEAL :
MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN PANCREÁTICA Y
HEPÁTICA DE LAS ISOFORMAS DE ÓXIDO NÍTRICO
SINTASA Y HEMOOXIGENASA Y PRODUCCIÓN DE
CITOCINAS PROINFLAMATORIAS**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Elena Fernández de Sevilla Gómez

Bajo la dirección de los doctores

José María Balibrea del Castillo
Elena Vara Ameigeiras
José Luis Balibrea Cantero

Madrid, 2013

Tesis Doctoral

Efecto citoprotector del tacrólimus en un modelo de sepsis de origen peritoneal

Modulación de la expresión pancreática y hepática de las isoformas de óxido nítrico sintasa y hemooxigenasa y producción de citocinas proinflamatorias

Elena Fernández de Sevilla Gómez

Directores:

Prof. José María Balibrea del Castillo

Prof^a. Elena Vara Ameigeiras

Prof. José Luis Balibrea Cantero

Universidad Complutense de Madrid



Tesis Doctoral

Efecto citoprotector del tacrólimus en un modelo de sepsis de origen peritoneal

Modulación de la expresión pancreática y hepática de las isoformas de óxido nítrico sintasa y hemooxigenasa y producción de citocinas proinflamatorias

Elena Fernández de Sevilla Gómez

Directores:

Prof. José María Balibrea del Castillo

Prof^a. Elena Vara Ameigeiras

Prof. José Luis Balibrea Cantero

Departamento de Cirugía y Biología Molecular

Facultad de Medicina

Universidad Complutense de Madrid

Dans la vie, rien n'est à craindre, tout est à comprendre.

Marie Curie

A mis padres, por todo lo que me han dado y la
sensación de haberles devuelto tan poco.



Informe de de los evaluadores especialistas en la materia de la Tesis Doctoral para su admisión a trámite (Artº 4.9 b) y 4.9 c) de la Normativa de desarrollo de los artículos 21 y 22 del R.D. 1393/2007.

DATOS DE LA TESIS DOCTORAL	
Nombre del Doctorando	<i>Elena Fernández de Sevilla Gómez</i>
Título de la Tesis	<i>Efecto citoprotector del tacrólimus en un modelo de sepsis de origen peritoneal</i>
Facultad o Centro	<i>Medicina</i>

DATOS DEL EVALUADOR		
Nombre	<i>Javier Arias Díaz</i>	
Centro	<i>Facultad de Medicina – Hospital Clínico San Carlos</i>	
D.N.I.	<i>24154107-J</i>	
Deberá indicarse si es interno o Externo al programa de posgrado	Interno <i>(táchese lo que proceda)</i>	Externo <i>(táchese lo que proceda)</i>

	VALORACIÓN DE LA TESIS			
	Muy Buena	Buena	Suficiente	Deficiente
Originalidad	X			
Definición Objetivos	X			
Metodología	X			
Relevancia Resultados	X			
Discusión / Conclusiones	X			

COMENTARIOS ADICIONALES:

(continuar por el reverso o adjuntar cuantas hojas adicionales considere oportuno)

La sepsis en enfermos trasplantados presenta características peculiares, en gran parte debidas al tratamiento inmunosupresor. El mérito de esta Tesis es profundizar en los mecanismos por los que un fármaco inmunosupresor, inhibidor de la calcineurina, modula mecanismos íntimos de la respuesta inflamatoria sistémica. Por ello creo que se trata de un trabajo muy recomendable y apto para ser defendido como Tesis Doctoral por Dña. Elena Fernández de Sevilla.

Madrid, a 19 de marzo de 2012

Fdo.: Javier Arias Díaz

Este impreso deberá entregarse al Órgano responsable del Programa de Posgrado para su estudio y aprobación en la admisión a trámite de la tesis doctoral. Asimismo, deberá incluirse entre la documentación enviada a la Comisión de Doctorado para la designación del Tribunal y aprobación de la defensa de la Tesis Doctoral (artº 4.13 de la Normativa de desarrollo de los artículos 21 y 22 del R.D. 1393/2007.



Informe de de los evaluadores especialistas en la materia de la Tesis Doctoral para su admisión a trámite (Artº 4.9 b) y 4.9 c) de la Normativa de desarrollo de los artículos 21 y 22 del R.D. 1393/2007.

DATOS DE LA TESIS DOCTORAL	
Nombre del Doctorando	Elena Fernández de Sevilla Gómez
Título de la Tesis	Efecto citoprotector del tacrólimus en un modelo de sepsis de origen peritoneal
Facultad o Centro	Medicina

DATOS DEL EVALUADOR		
Nombre	Benjamín Oller Sales	
Centro	Universitat Autònoma de Barcelona; Dpto. Cirurgia; Hospital Germans Trias i Pujol	
D.N.I.	37656114-P	
Deberá indicarse si es interno o Externo al programa de posgrado	Interno (táchese lo que proceda)	<u>Externo</u>

	VALORACIÓN DE LA TESIS			
	Muy Buena	Buena	Suficiente	Deficiente
Originalidad	X			
Definición Objetivos	X			
Metodología	X			
Relevancia Resultados	X			
Discusión / Conclusiones	X			

COMENTARIOS ADICIONALES:

El presente trabajo ahonda en los mecanismos de acción del tacrólimus poniendo de manifiesto los beneficios que su efecto anti-inflamatorio inespecífico tendría en situaciones de sepsis abdominal. Tanto el diseño como la metodología son excelentes y aportan información con suficiente trascendencia como para generar nuevas aplicaciones clínicas. Está bien estructurado y tanto la presentación de resultados como la discusión son de una alta calidad. Por otra parte, es de destacar que el mismo ha sido publicado en una revista de contrastada relevancia como es "Nitric Oxide". Por todo ello se considera que el trabajo es apto para ser defendido como Tesis Doctoral por Dña. Elena Fernández de Sevilla.

Badalona, a 10 de abril de 2012

Fdo.:

Este impreso deberá entregarse al Órgano responsable del Programa de Posgrado para su estudio y aprobación en la admisión a trámite de la tesis doctoral. Asimismo, deberá incluirse entre la documentación enviada a la Comisión de Doctorado para la designación del Tribunal y aprobación de la defensa de la Tesis Doctoral (artº 4.13 de la Normativa de desarrollo de los artículos 21 y 22 del R.D. 1393/2007).

Agradecimientos

A la hora de dar las gracias a todas aquellas personas que me han ayudado de una manera u otra en la confección de este trabajo, espero ser justa, no olvidarme de nadie y mostrar la efusividad suficiente en agradecer el papel que han desempeñado en mi vida en este tiempo.

En primer lugar, me gustaría dar las gracias a las personas a las que debo casi todo: mis padres. Por cómo me educaron, los valores transmitidos, pero la libertad para ejercerlos. Por haberme ayudado a crecer, a convertirme en lo que soy ahora. Por haber apoyado todas mis decisiones, entendiéndolas o no; por su amor incondicional. Por supuesto, gracias a mis hermanas, Lola y Begoña, por su ejemplo a seguir. El trabajo en mi tesis ha estado inspirado en gran parte por el trabajo de Lola en la suya... Mi vida entera está inspirada en la de ambas en muchos aspectos.

No podrían faltar en estas líneas los que han sido mis compañeros de viaje en todo este tiempo, grandes amigos, casi hermanos. Desde el primer año de Facultad, algunos incluso desde antes, viendo como mis sueños de cirujana poco a poco se iban volviendo realidad. Cómo no han dejado de apoyarme, de animarme, de quererme en el camino, pese a la distancia y la constante falta de tiempo. María Brotat, Sonsoles Gutiérrez, Pablo Vadillo, Teresa Panadero, José María Ahijado, Elena Floristán, Ángel Manuel Iniesta, Salvador de la Torre, Raquel Gómez, Rodrigo Garcés, Rosa Alcobendas y Virginia Sánchez; a vosotros os debo mucho más de lo que pensáis.

Gracias sinceras a mi amiga Patricia Domínguez, por hacer que nos creyéremos que el mundo es un poco menos mediocre... Y ver juntas cómo muchos sueños al final sí que se cumplen.

Mi agradecimiento hacia la que es mi tutora en la Residencia, pero mucho más que eso también, Cristina Dopazo. Por su buen humor, sus ganas de enseñar, su preocupación continua por mí... por permitirme volar casi todo el tiempo.

Gracias a Laia Blanco, por su visión realista del mundo, por estar siempre dispuesta a escucharme; por unas sabias palabras en un mal momento.

Gracias a Gonzalo Sapisochín, por recordarme tan a menudo la necesidad de terminar esta tesis. Su casi insoportable inagotabilidad física y mental, su insistencia y su genialidad lo convierten en un estímulo continuo para que cada día quiera ser un poco mejor.

Gracias a María José Mañas, Roberto Rodríguez, Janice Velasco y Amaia Gantxegi. Son cuatro de mis grandes ejemplos a seguir para el futuro.

Mi agradecimiento hacia Luis Salgado, todo un apoyo en este período, por encontrarse él mismo en uno similar. Por su capacidad de afrontar cualquier cosa con una sonrisa, y casi conseguir que yo lo haga.

Gracias a Marc Beisani por no quedarse en la superficie de las cosas; por cuestionárselo todo... y hacer que yo también me lo cuestione. Por hacerme pensar que la ciencia aún estará viva mucho tiempo... Y que nosotros podemos ser los protagonistas.

Muchas gracias a mi compañera y gran amiga Alba Lara. Gracias por estar ahí en cada momento, por haber vivido todas mis idas y venidas con este proyecto, entre otros... y apoyarme siempre.

Mil gracias a Juan Echeverri. Decir compañero se queda corto y amigo casi también... Mil gracias al que ha sido mi mejor medicina en los malos momentos estos dos años, pero pieza clave en los buenos también. Mil gracias por tantas y tantas horas

de conversación; por sus siempre valiosos consejos; por desmontar el mundo juntos y volverlo a montar después; por devolverme siempre la serenidad, y una sonrisa. Gracias por mostrarme que de cualquier situación se puede obtener una enseñanza. Mil gracias por su ya mítica frase *“Mucha tranquilidad”* en medio de mi caos habitual.

También aquí quisiera expresar mi sincero agradecimiento hacia dos personas que igual no son conscientes de lo importantes que han sido en que esta tesis haya sido llevada a cabo con éxito. Ellas son Pilar y Paula, secretaria del Servicio de Cirugía del Hospital Clínico San Carlos y secretaria del Departamento de Cirugía de la Universidad Complutense. Gracias a las dos por el tiempo dedicado, la solución a todas mis dudas y problemas planteados. Pero sobre todo gracias por la manera en la que lo han hecho, siempre con una palabra cariñosa.

Mi agradecimiento hacia Elena Vara; por haberme brindado la oportunidad de embarcarme en este proyecto con ella; por haberme prestado su experiencia, su apoyo y siempre buenos consejos.

Casi imposible de expresar con palabras mi agradecimiento hacia el Profesor Balibrea, Profesor con mayúsculas y fuente de inspiración para mí desde que nos conocimos, hace ya siete años. En primer lugar darle las gracias por lo que ya lo hice una vez, porque probablemente ha sido una parte fundamental en mi vocación como cirujana. Pero también por cómo me inculcó desde estudiante la necesidad de investigar, de no limitarme a la clínica, de ir más allá, de creer en la ciencia y participar de ella. Es difícil expresar su capacidad docente, cómo me transmitió su saber, cómo eleva el concepto de Universidad a lo que en realidad debería ser. Mi agradecimiento porque me ha dado algunos de los consejos más valiosos de mi vida, de los que no me

he arrepentido hasta ahora. Se lo dije hace ya casi siete años, que tenía la sensación de que aún tenía mucho por dar y yo por recibir... No he cambiado de idea.

Ya casi acabando, me gustaría dar las gracias al que ha sido mi guía todo este tiempo, de alguna forma, mi mentor. Me refiero a José María Balibrea, cuya capacidad como docente es probablemente sólo superada por su potencial como cirujano y científico. Gracias por considerarme para formar parte de este proyecto, por creer en mí casi más que yo misma. Gracias por acompañarme en este camino, por ayudarme a superar los obstáculos, por ser capaz de fascinarme con cada conversación. Ya se lo he dicho en ocasiones, pero no deja de sorprenderme su capacidad de convertir lo difícil en fácil, por hacer que, de pronto, una discusión científica surja casi sin darme cuenta. Gracias por ser mucho más que un maestro, un verdadero amigo. Gracias por haber influido tanto y tan positivamente en mi vida.

Y ya por último, puede parecer banal, pero no lo fue tanto en el día a día; mi agradecimiento a los que han puesto la banda sonora a la escritura de esta tesis. Bach, Vivaldi, Leonard Cohen, Elvis, Manel... Gracias a The Beatles, porque son la banda sonora de mi tesis y de mi vida.

Barcelona, a 7 de febrero de 2012

ÍNDICE

I. Introducción

- a. Aproximación al tema
- b. Fundamentos
 - i. Tacrólimus
 - ii. Respuesta inflamatoria inespecífica
 - iii. Sepsis y shock séptico

II. Hipótesis

- a. Objetivo general
- b. Objetivos particulares

III. Material y métodos

- a. Animales
- b. Homogeneizados de tejido
- c. Parámetros a medir
- d. Análisis estadístico

Apéndice

IV. Resultados

- Expresión tisular de mediadores endógenos y marcadores de estrés oxidativo

- i. Expresión de mediadores en tejido
 - ii. Expresión tisular de las diferentes isoformas de Hemooxigenasa en tejidos
 - iii. Expresión tisular de las diferentes isoformas de Óxido nítrico sintasa
- Concentración plasmática de mediadores endógenos y marcadores de estrés oxidativo

V. Discusión

VI. Conclusiones

VII. Bibliografía

Introducción

APROXIMACIÓN AL TEMA

Tras el transplante de un órgano abdominal, como puede ser el hígado o el páncreas, se producen una serie de eventos fisiopatológicos que pueden afectar a la viabilidad y la función inmediata de dichos órganos. Durante las primeras 24-48 horas tras el implante de un órgano, los fenómenos de isquemia-reperfusión y los asociados a la respuesta inmune inespecífica pueden activar mecanismos deletéreos asociados a unos pobres resultados clínicos post-transplante (1). La isquemia que se produce sobre un órgano que ha sido previamente transplantado se asocia a la producción masiva de especies reactivas de oxígeno y mediadores inflamatorios, lo cual provocará una amplificación de las señales de daño intracelular (2). La generación *de novo* de estrés oxidativo tras la estimulación de diferentes enzimas como la óxido nítrico sintetasa y la hemooxigenasa ha sido observada tras la producción de daño en hígado y páncreas por diferentes agentes, como la isquemia y las citocinas proinflamatorias, o la exposición al lipopolisacárido de bacterias Gram negativas (3,4). Por otra parte, el aumento en la liberación sistémica de mediadores inflamatorios como Interleucina-1 y factor de necrosis tumoral ha sido descrito como agente responsable en diferentes mecanismos de daño tisular tras el transplante de un órgano. Asimismo, la hipoperfusión esplácnica durante el transplante de un órgano abdominal se asocia con la presencia de translocación bacteriana y la sobreexposición a lipopolisacárido, contribuyendo a un aumento de la respuesta inmune aguda (5). Además, se conoce que el lipopolisacárido de bacterias Gram negativas activa tanto *in vivo* como *in vitro* la respuesta inmune aguda incluyendo la producción de estrés oxidativo *de novo*, así como la producción de citocinas. El aumento local en la producción de especies

reactivas de oxígeno y de mediadores inflamatorios ha sido observado tanto en el tejido hepático como pancreático tras la estimulación con lipopolisacárido (6,7). Ambos órganos, especialmente el páncreas, contribuyen de manera importante a amplificar la respuesta inflamatoria produciendo grandes cantidades de marcadores durante la respuesta inflamatoria inespecífica (8). Los receptores de estos órganos tienen mayor riesgo de sufrir infecciones por bacterias Gram negativas debido a los tratamientos inmunosupresores que se utilizan tras el trasplante. El lipopolisacárido bacteriano juega un papel crucial en la fisiopatología de las infecciones de pacientes transplantados al activar la respuesta inflamatoria inespecífica, generando estrés oxidativo y la producción masiva de mediadores proinflamatorios. Se ha observado que algunos agentes inmunosupresores de los que se utilizan para el tratamiento contra el rechazo tras el trasplante de hígado y páncreas, como el tacrólimus, tienen efectos citoprotectores adicionales (11). Así, el tacrólimus ha sido estudiado en diferentes modelos experimentales de citotoxicidad, isquemia-reperfusión y exposición a estímulos proinflamatorios en tejido hepático y pancreático, observándose una disminución en la producción de citocinas y estrés oxidativo (12,13). Aunque estos efectos antioxidante y antiinflamatorio del tacrólimus son conocidos, los posibles mecanismos moleculares, la órgano-especificidad y la dosis-dependencia no han sido bien esclarecidos.

FUNDAMENTOS

TACRÓLIMUS

El tacrólimus (FK-506) se trata de un macrólido inmunosupresor obtenido por fermentación a partir de *Streptomyces tsukubaensis*, un hongo aislado del suelo de la región de Tsukuba (Japón) en 1984. Las primeras publicaciones en la literatura sobre FK-506 son de 1987, refiriéndose a él como un potente inmunosupresor que actuaba in Vitro obteniendo la inhibición de Interleucina-2 (IL-2) y la respuesta del cultivo linfocitario mixto (CLM) con concentraciones de 32 a 100 veces inferiores a las de la ciclosporina (14).

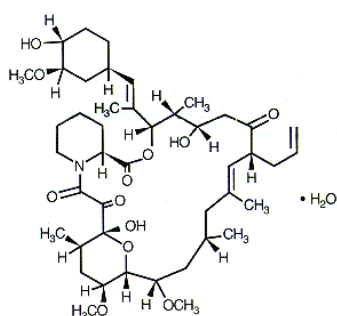


FIGURA 1: Molécula de FK-506

El FK-506 induce una inmunosupresión al inhibir la primera fase de la activación de las células T. En esta primera fase, se activa la transcripción de ciertos factores que permiten que las células T progresen desde la fase G0 a la G1, como la IL-2, IL-3, IL-4, el factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) y de Interferon gamma (IF- γ). El FK-506 se fija a una inmunofilina, la FKBPB12, formando un complejo que inhibe la actividad de fosfatasa de la calcineurina. Debido a que la calcineurina activada es capaz de defosforilar el componente citoplasmático del factor nuclear de los linfocitos T activados (NF-ATC), una reacción crítica para la transcripción del gen de

las linfocinas, la inhibición de la calcineurina tiene como resultado el bloqueo de la activación de las células B y T. La reducción de los niveles de los activadores de las células T, disminuye la respuesta proliferativa de estas células T frente a antígenos y mitógenos (14,15,16).

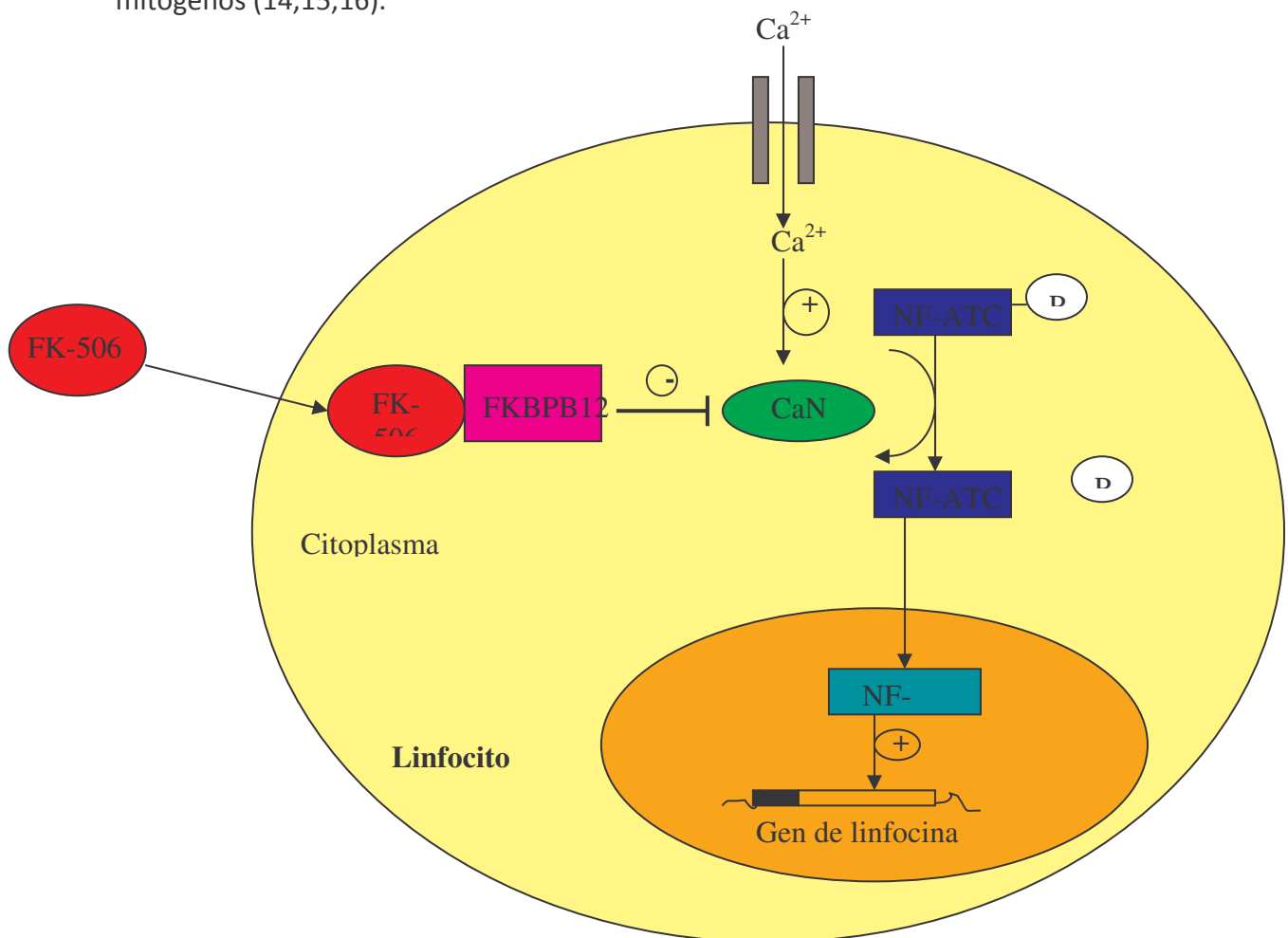


FIGURA 2: El FK-506 inhibe la primera fase de activación de las células T, inhibiendo la transcripción de ciertos factores que permiten la progresión de la fase G0 a la G1. El FK-506 se une a una inmunofilina, la FKBP12, formando un complejo que inhibe la actividad fosfatasa de la calcineurina, lo cual resultará en el bloqueo de la transducción de un factor nuclear necesario para la activación de las células B y T.

El FK-506 se administra por vía oral, parenteral y tópicamente. Su metabolismo se realiza vía el sistema enzimático hepático citocromo P450 3A4 (15).

El FK-506 ha sido ampliamente estudiado en pacientes transplantados de hígado, pulmón, corazón, páncreas, intestino delgado y médula ósea, siendo muy efectivo en la prevención del rechazo resistente a corticoides y ciclosporina. Se administra habitualmente en combinación con otros inmunosupresores durante el postoperatorio inicial, dependiendo la dosis de la pauta inmunosupresora elegida. Normalmente la dosis puede ser reducida en la etapa de mantenimiento, siendo posible en algunos casos, retirar el tratamiento inmunosupresor concomitante, realizando monoterapia sólo con FK-506. La dosis empleada en cada paciente se estima en función de la evaluación clínica del rechazo y la tolerancia individual al fármaco (15).

Como tratamiento para el rechazo de órganos transplantados, se utilizan dosis elevadas de FK-506, concomitantemente con corticoesteroides y ciclos cortos de anticuerpos poli/monoclonales (15).

Existen varias técnicas para determinar la concentración de FK-506 en sangre, utilizándose en la práctica clínica habitual métodos de inmunoensayo. Los niveles mínimos de FK-506 deben ser especialmente controlados en el primer período de tiempo tras el trasplante. Cuando la administración se realiza por vía oral, los niveles valle en sangre deben analizarse aproximadamente doce horas después de la dosis, estando condicionada la frecuencia en la determinación de dichos valores según las necesidades clínicas individuales de cada paciente (14,15).

El análisis de los estudios clínicos indica que en la mayoría de los casos, los niveles de FK-506 por debajo de 20 ng/ml son suficientes para un correcto control del paciente, siendo muy importante valorar la situación clínica del paciente al interpretar los niveles en sangre. (15).

El tratamiento con FK-506 aumenta la susceptibilidad de los pacientes a las infecciones y al desarrollo de patología neoplásica, propiciando especialmente la aparición de linfomas. Cuando la administración es sistémica son usuales las infecciones víricas, especialmente por virus herpes, bacterianas, fúngicas y protozoarias. El tratamiento sistémico se relaciona con una importante nefrotoxicidad, debiendo evitarse el uso concomitante de otros fármacos nefrotóxicos como puede ser la ciclosporina. Debe usarse con precaución en pacientes previamente hipertensos, ya que la administración de FK-506 se ha asociado con hipertensión moderada, habiéndose descrito algunos casos de hipertensión severa. Asimismo, el uso de este fármaco está asociado a un aumento de prevalencia de diabetes mellitus (DM), especialmente entre individuos de raza negra o hispanos. Al igual que con otros agentes inmunosupresores y debido al riesgo potencial de alteraciones malignas de la piel, debe minimizarse la exposición a luz solar y a los rayos ultravioleta. Otras reacciones adversas frecuentes son alteraciones en el recuento de células sanguíneas, temblor, dolor de cabeza, diarrea, náuseas, alteraciones isquémicas de las arterias coronarias, prurito, rash, alopecia, artralgia, calambres musculares, dolor en las extremidades, dolor de espalda, hiperpotasemia, astenia, alteraciones febriles, aumento del peso e insomnio, entre otras (15,17).

Asimismo, recientemente se está comenzando a utilizar en la terapia de enfermedades autoinmunes, como la blefaroconjuntivitis, la dermatitis atópica, las lesiones faciales de la psoriasis, el liquen plano mucoso, la dermatitis seborreica, el vitíligo segmentario en niños, especialmente sobre lesiones faciales, la enfermedad inflamatoria intestinal y la artritis reumatoide (18,19,20). Sólo el 0.5% del FK-506 aplicado en la piel se detecta en sangre, incluso cuando se tratan amplias superficies

cutáneas (19). Sí que se han observado concentraciones aumentadas del fármaco en sangre cuando se ha aplicado en patologías con compromiso considerable de las barreras cutáneas. Para su uso tópico, suelen emplearse concentraciones de FK-506 de 0.03% o 0.1%, siendo sus efectos adversos más frecuentes sensación de ardor o calor tras la aplicación, que dura entre 30 y 90 minutos. El aumento de incidencia de infecciones tras la administración del fármaco por esta vía es muy bajo, habiéndose observado un ligero aumento en infecciones por el virus de la varicela y el del herpes simple (21). En el caso del liquen plano mucoso oral sintomático se ha observado un alivio rápido pero muy transitorio (22). En relación a la colitis ulcerosa, aunque ha sido casi exclusivamente utilizado en ensayos clínicos solamente, el FK-506 ha demostrado ser efectivo en la supresión de los brotes (18).

No obstante, aparte de lo ya descrito, existen otros efectos diferentes relacionados con el FK-506, que podríamos considerar *citoprotectores*. Por un lado, este fármaco está implicado en fenómenos asociados a respuesta inflamatoria inespecífica, como la liberación de mediadores proinflamatorios y el aumento del estrés oxidativo, así como la disminución de procesos apoptóticos. Estos fenómenos han sido observados en diferentes situaciones clínicas, especialmente en situaciones de daño neuronal, pancreatitis aguda y modelos de isquemia-reperfusión hepática, entre otras. También, en relación con este inmunosupresor, se ha observado que tiene un efecto de regeneración y reparación tisular, lo cual parece tener un potencial importante en el campo de la dermatología(16,21,23,24).

RESPUESTA INFLAMATORIA INESPECÍFICA

El concepto de inflamación ya se empleaba en la antigüedad. Buenos ejemplos de ello suponen el médico romano del siglo I, Celso, con su descripción del “cuadrilátero de la inflamación”: calor, rubor, tumor y dolor; el patólogo alemán del siglo XIX, Virchow, que adicionó el término de impotencia funcional; o Hunter, anatomista y cirujano escocés del siglo XVIII, que afirmó que la inflamación no se trataba de una enfermedad, sino de una respuesta inespecífica que producía un efecto saludable en el organismo donde tenía lugar (25).

La respuesta inflamatoria inespecífica (R.I.I.) consiste en un conjunto de fenómenos en los que se encuentran implicados diferentes sistemas, como el nervioso, el endocrino y el inmunológico, siendo éste último el que parece desarrollar un papel más importante.

El sistema inmune surgió durante la evolución para combatir agresiones externas, ya sean microorganismos, traumatismos, etc.

Existen dos tipos de mecanismos desarrollados por el sistema inmune, innatos y adaptativos, cuya principal diferencia reside en las estructuras de reconocimiento del agente nocivo, ya que los mecanismos efectores de destrucción son básicamente similares (26).

La R.I.I. no se basa en reconocer cada patógeno en particular, sino en reconocer un grupo de patrones moleculares altamente conservados comunes a un grupo o familia entera de agentes lesivos. Por ello, todos los individuos de una especie, nacen con la capacidad innata e inmediata de desarrollar una respuesta ante determinados agentes contra los cuales nunca antes habían entrado en contacto. Por tanto, la R.I.I. es capaz de controlar de manera rápida y eficaz una situación lesiva para el organismo

en sus primeros momentos, mientras que se desarrollan mecanismos adaptativos, que jugarán un papel fundamental en el caso de que la respuesta inespecífica no sea capaz de combatir el agente agresor, a partir del quinto y séptimo día.

La inmunidad inespecífica se basa en la activación de, por un lado, una serie de moléculas preformadas- las proteínas del complemento- y por otro lado, una serie de células: monocitos/macrófagos, neutrófilos y mastocitos, que tienen receptores innatos para múltiples patógenos. Además de éstos, existen algunos mecanismos innatos que no actúan inmediatamente, sino que se inducen como respuesta ante el agente lesivo, como son los linfocitos natural killer (NK) o ciertas moléculas como los interferones o las citocinas (27).

Células implicadas en la R. I. I.

a) Monocitos/macrófagos y neutrófilos

Son los componentes celulares innatos del sistema inmune. Tienen la capacidad de poder reconocer directamente patrones moleculares altamente conservados presentes en numerosos agentes patógenos, de ingerirlos y destruirlos por diferentes mecanismos físicos, químicos o enzimáticos. Además, en el caso de los macrófagos o los mastocitos, cuando interaccionan con el agente agresor, secretan citocinas y otros mediadores de la inflamación que atraen a otras células y moléculas inmunológicas. Asimismo, los macrófagos tienen un importante papel en la respuesta adaptativa.

b) Mastocitos

Relacionados con fenómenos de alergia, secretan sustancias vasoactivas preformadas y almacenadas en sus gránulos, como la histamina y la triptasa y mediadores lipídicos derivados de su membrana. Esta liberación de sustancias produce un rápido aumento del flujo sanguíneo local, aumento de la permeabilidad vascular y contracción del músculo liso, lo que provoca un reclutamiento de elementos de la respuesta inmune al lugar de la inflamación.

c) Linfocitos NK

Estas células tienen capacidad citolítica y reguladora de la respuesta inmune e intervienen en la defensa de tipo innato frente a patógenos virales, tumores y rechazo de transplantes. Su capacidad citolítica puede activarse por una vía dependiente de anticuerpo y que está controlada por la molécula CD16 expresada en la mayoría de las células NK. También puede ejercer citotoxicidad independiente de anticuerpo (27).

Mediadores endógenos de R. I. I.

La respuesta inflamatoria se activa, amplifica y se perpetúa gracias a la secreción de sustancias químicas endógenas. Siendo los mediadores endógenos más importantes las citocinas, también existen muchos otros, como la cascada de la coagulación, el factor activador de plaquetas (PAF), los derivados el ácido araquidónico, etc.

Las citocinas, descritas por primera vez en 1981, son factores solubles producidos mayoritariamente por leucocitos que intervienen en la regulación de las

células del sistema inmune y los procesos inflamatorios. Las citocinas incluyen a las interleucinas (IL), interferones (IF), monocinas y quimiocinas.

Las citocinas son polipéptidos o glicoproteínas con un peso molecular menor de 30 kDa que ejercen su función actuando sobre receptores específicos de membrana y contribuyen a la activación, blastogénesis y/o diferenciación en células efectoras, regulando también otros procesos como la apoptosis, adquisición de capacidad citotóxica y la recirculación de los leucocitos.

Los efectos y la síntesis de las citocinas no se limitan al sistema inmune, ya que se ha observado que estas moléculas pueden regular la función de las células de otros órganos y tejidos. Por otro lado, el estado funcional de las células del sistema inmune es modulado por moléculas aparentemente propias de otros sistemas tales como el sistema nervioso o el endocrino, sugiriendo la integración global de todos ellos dentro del organismo.

La secreción de citocinas es un suceso breve y autolimitado. En general no se almacenan en la célula, y su síntesis se inicia por una nueva transcripción génica de corta duración. La síntesis de citocinas es por tanto un proceso transitorio, siendo su modo de acción autocrino, yuxtacrino o paracrino. Muchos tipos individuales de citocinas pueden producirse por diversos tipos celulares. Poseen la propiedad de aumentar o suprimir la producción de otras citocinas, lo cual proporciona un mecanismo regulador muy importante para la respuesta inmune. Las citocinas son moléculas pleiotrópicas, es decir, actúan sobre diferentes tipos de células induciendo en ellas efectos variados. En muchos casos, una citocina puede interaccionar con diferentes tipos celulares que expresan receptores para ella, presentando una única

célula receptores para múltiples citocinas. La unión de una citocina a su receptor altera la expresión de receptores tanto para la propia citocina como para otras (25).

Factor de necrosis tumoral

El factor de necrosis tumoral (TNF- α) es una proteína que existe en una forma libre y también como molécula de membrana. Es producido por células T activadas, mastocitos y macrófagos tras estimulación por endotoxinas bacterianas, factor estimulador de colonias de macrófago (M-CSF), IFN- γ IL-2 o IL-15. El TNF- α fue descrito como factor tóxico para algunas células en cultivo y causante de necrosis hemorrágica de tumores *in vivo*. Es el principal mediador de la respuesta inmune frente a bacterias Gram negativas. El estímulo más potente para su producción son los lipopolisacáridos bacterianos (16).

El TNF- α ejerce numerosos efectos *in vivo* que son muy dependientes de su concentración. A concentraciones bajas, el TNF- α actúa localmente como un mediador paracrino que provoca aumento de la adhesividad de las células endoteliales de los vasos, activación leucocitaria y estimulación de la producción de IL-1, IL-6 e IL-8 en los fagocitos mononucleares. También coestimula la activación de linfocitos T y B. En células del endotelio vascular y fibroblastos, estimula la producción de CSFs y aumenta la expresión de moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) de clase I. Cuando las cantidades de TNF- α son mayores, éste actúa de modo endocrino y provoca acciones sistémicas: estimula la producción de reactantes de fase aguda por el hígado y la producción de IL-1 e IL-6 en células del endotelio vascular; activa el sistema de coagulación e induce fiebre; suprime la proliferación de las células progenitoras hematopoyéticas de la médula ósea y contribuye a la inducción del estado caquéctico.

Las concentraciones extremadamente elevadas de TNF- α deprimen la contractilidad del miocardio con la consiguiente reducción de la perfusión tisular, relajan el tono del músculo liso vascular, contribuyendo a la disminución de la presión sanguínea y provocan coagulación intravascular diseminada, ocurriendo así en las sepsis por Gram negativos (25).

Sobre los monocitos, el TNF- α induce un aumento de la expresión de moléculas de clase I del MHC y liberación de IL-1, cuyas propiedades biológicas se solapan a las del TNF- α . Los linfocitos T en reposo carecen de receptores para TNF- α , que aparecen tras su estimulación antigénica. Sobre las células T activadas, el TNF- α incrementa el número de receptores para la IL-2 y aumenta la proliferación y la producción de IF- γ inducidas por la IL-2. Los linfocitos T activados secretan simultáneamente TNF- α e IF- γ . También los linfocitos B producen TNF- α cuando son activados por el antígeno. En presencia de IL-2, el TNF- α incrementa la expresión de receptores para IL-2 en células NK, así como su actividad citotóxica. Parece probable la existencia de algún lazo de regulación autocrino, ya que las células NK son capaces de producir TNF- α (23).

Interleucina-1

La Interleucina-1 (IL-1) ejerce una amplia gama de efectos en una extensa variedad de células. Las diferentes actividades de la IL-1 son el resultado de los efectos de dos proteínas diferentes (IL-1a e IL-1b). A pesar de tener menos de un 30% de homología en su secuencia aminoacídica, ambas moléculas se unen a dos receptores muy similares entre sí: IL-1RI (CDw121a) e IL-1RII (CDw121b) y tienen similares actividades biológicas. La IL-1 es segregada por muchos tipos de células, tras su estimulación por diferentes señales activadoras. Los monocitos y los macrófagos

secretan IL-1 en respuesta a productos bacterianos tales como endotoxinas, inmunocomplejos, fragmentos moleculares de degradación del complemento, en particular C5a, y citocinas, como el GM-CSF, el TNF- α y el IF- γ . Los receptores para la IL-1 se encuentran en diversos tipos celulares (28).

La IL-1 en bajas concentraciones tiene funciones inmunorreguladoras a nivel local actuando como coestímulo para la activación de las células T, incrementando la proliferación de los linfocitos CD4 y el crecimiento y la diferenciación de células B. Además, induce el aumento de su propia síntesis y la producción de otras citocinas, tales como IL-6 e IL-8 por monocitos y células endoteliales, IL-6 por los fibroblastos o la IL-2 por células T, y estimula la expresión de receptores de citocinas en diferentes tipos celulares, incluyendo células hematopoyéticas y células T. La IL-1 durante la activación del linfocito B, actúa sinérgicamente con otras linfocinas, favoreciendo su progresión en el ciclo celular. También actúa sobre las células endoteliales promoviendo la coagulación y la adhesión linfocitaria (25).

A concentraciones mayores la IL-1 ejerce una acción endocrina y provoca, a nivel sistémico, algunos de los efectos que produce el TNF- α : fiebre, síntesis de proteínas de fase aguda y caquexia. Por otro lado, tiene efectos diferentes a los del TNF- α ya que no produce daño tisular por sí misma y no es letal, tampoco causa necrosis hemorrágica de tumores, ni lisa células tumorales *in vitro*. No incrementa la expresión de moléculas del MHC ni inhibe el crecimiento de las células hematopoyéticas de médula ósea sino que potencia las acciones de los CSF sobre estas células. Finalmente, la acción IL-1 es más potente que la del TNF- α como coestimulador de las respuestas de los linfocitos T (29).

Lipopolisacárido bacteriano como principal activador de la R.I.I. en situaciones de sepsis

Los organismos animales reconocen determinadas moléculas microbianas como señales de que han sido invadidos por un microorganismo. El lipopolisacárido bacteriano (LPS) constituye el antígeno O y la endotoxina de las bacterias Gram negativas, siendo la molécula de señalización más potente y mejor estudiada. Está localizado en la membrana externa de la envoltura celular bacteriana y juega un importante papel en la patogénesis de las infecciones bacterianas, siendo el principal causante del shock séptico. Básicamente, el LPS se compone de una porción lipídica muy conservada entre las especies, llamada lípido A, que se halla en la cara externa de la membrana externa de la bacteria, y una porción hidrofílica compuesta por azúcares que presenta una gran variabilidad estructural. El lípido A es el responsable de las propiedades fisiopatológicas de las endotoxinas. El polisacárido O le confiere a la bacteria su especificidad serológica. El oligosacárido nuclear, también conocido como core, une el polisacárido O al lípido A (30).

Una vez que se halla en el torrente sanguíneo, el LPS estimula diferentes tipos celulares mediante moléculas de reconocimiento como el CD14, receptor de membrana de macrófagos/monocitos. Para realizar tal acción, necesita de al menos dos proteínas intermediarias, el TLR-4 (*Receptor "Toll-like" 4*) y la MD-2 (*Proteína de diferenciación mieloide 2*). El LPS provoca una importante activación de células inflamatorias, sobre todo macrófagos tisulares, los cuales van a producir importantes cantidades de mediadores endógenos, como IL-1 y TNF- α , actuando de esta manera como amplificadores de la respuesta inflamatoria (16).

El LPS, por tanto, actuará disparando diversas vías de transducción que interaccionan entre sí, destacando dentro de éstas la vía de las MAP kinasas y la cascada de los TLR, que a su vez actúan sobre factores de transcripción. Uno de los principales factores nucleares es el factor nuclear kappa B (NF- κ B), que desempeña un papel fundamental en la inducción de enzimas implicadas en la producción de citokinas y autacoides, tales como la óxido nítrico sintetasa o la ciclooxygenasa inducible (31).

ESTRÉS OXIDATIVO COMO EJEMPLO DE VÍA EFECTORA DE DAÑO TISULAR EN LA R.I.I.

El daño o estrés oxidativo se define como la exposición de la materia viva a diversas fuentes que producen un desbalance en el equilibrio existente entre las sustancias o factores prooxidantes y los mecanismos antioxidantes encargados de eliminar dichas especies químicas, ya sea por un déficit de estas defensas o por un incremento exagerado de la producción de especies reactivas de oxígeno, lo cual conlleva a la aparición de una serie de alteraciones de la relación estructura-función en cualquier órgano, sistema o grupo celular especializado (32).

Desde el punto de vista químico, los radicales libres son todas aquellas especies químicas, cargadas o no, que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado que les da una configuración espacial la cual provocará gran inestabilidad. Son muy reactivos y tienen una vida media corta, por lo que actúan en las inmediaciones del lugar en el cual se forman (32). Son pequeñas moléculas que se producen por diferentes mecanismos, siendo los principales el anión superóxido, estando su origen biológico más importante en sistemas/ cadenas de transporte de electrones (mitocondrial, del retículo endoplásmico) y la fagocitosis/histolisis por parte

de células del sistema inmunitario a través del complejo NADPH-oxidasa, el peróxido de hidrógeno, que aparece principalmente a partir de la dismutación del radical superóxido, pero también se genera *de novo* mediante el sistema del citocromo p450 y la monoaminoxidasa (MAO) y el radical hidroxilo, siendo generado mediante dos reacciones, la de Fenton, en la que se unen peróxido de hidrógeno y anión ferroso, y la reacción de Haber-Weiss, uniéndose anión superóxido y peróxido de hidrógeno (16).

No obstante, los radicales libres del oxígeno juegan un papel importante en aspectos fisiológicos del organismo, como participar en la fagocitosis, favorecer la síntesis de colágeno y la síntesis de prostaglandinas, disminuir la síntesis de catecolaminas por las glándulas suprarrenales, provocar modificaciones de la membrana celular y favorecer la quimiotaxis.

Los radicales libres se generan a nivel intracelular y extracelular. Entre las células relacionadas con la producción de radicales libres del oxígeno están los neutrófilos, monocitos, macrófagos, eosinófilos y las células endoteliales. Las enzimas oxidantes involucradas son la xantina-oxidasa, la indolaminoxigenasa, la triptofano-dioxigenasa, la mieloperoxidasa, la galactosa oxidasa, la ciclooxigenasa, la lipoxigenasa, la monoamino-oxidasa y la NADPH oxidasa (33).

El término *especies reactivas de oxígeno* se define como el conjunto de radicales libres y sustancias, que no siendo radicales, llevan asimismo a la elevación de agentes prooxidantes.

Las especies reactivas de oxígeno se clasifican en radicales libres inorgánicos o primarios, de vida media muy corta, incluyéndose en este grupo el anión superóxido, el radical hidroxilo y el óxido nítrico; radicales libres orgánicos o secundarios, de vida media algo más larga que los anteriores, entre los que se encuentran el carbono, el

nitrógeno, el oxígeno y el azufre; y los intermediarios estables relacionados con los radicales libres de oxígeno, entre los que se hallan el peróxido de hidrógeno, el ácido hipocloroso y el peroxinitrito, entre otros (32,33).

Las especies reactivas de oxígeno aparecen en procesos inflamatorios y fenómenos de isquemia reperusión tras la activación de sus enzimas productoras, como son la óxido nítrico sintetasa y la hemooxigenasa (34).

Óxido nítrico y Óxido nítrico sintasa

De manera paralela a las investigaciones de autores como Ignarro o Moncada, en 1980, Furchgott y Zawadzki demostraron la necesaria presencia del endotelio vascular para producir la relajación de un anillo de aorta torácica de conejo inducida por la acetilcolina y concluyeron que ésta era producida por una sustancia difusible liberada por el endotelio, que denominaron *Endothelium Derived Relaxing Factor* (EDRF). En 1987, Palmer et al identificaron el EDRF como óxido nítrico (NO), el cual mediaba indirectamente la acción vasorrelajante de la acetilcolina (34).

A partir de entonces, el NO se ha considerado un compuesto muy importante para la fisiología del organismo debido al alto número de funciones que desarrolla en él. Se trata de un gas simple que se libera por la conversión de L-Arginina en L-citrulina, necesitándose de calmodulina y cuatro cofactores, que son flavin mononucleótido, flavin adenina dinucleótido, tetrahidrobiopterina y NADPH. La enzima que cataliza esta reacción es la Óxido nítrico sintasa (NOS), habiéndose identificado tres isoformas de la misma: endotelial o tipo III (eNOS), neural o tipo I (nNOS) y calcio independiente (iNOS), también conocida como inducible (34,35).

Tanto la tipo eNOS como la nNOS son calcio/calmodulina dependientes, constitutivas, se encuentran en el citosol de la célula, y sólo producirán importantes cantidades de NO al ser activadas por una elevación de calcio intracelular. Están codificadas en los cromosomas 2 -endotelio- y 12 –neuronas, plaquetas-(34,16).

La iNOS es también conocida como inducible o tipo macrófago, encontrándose mayoritariamente en células del sistema retículo-endotelial, codificándose en el cromosoma 17. Es inducida por la liberación endógena de citoquinas proinflamatorias y endotoxinas, produciéndose en estos casos grandes cantidades de NO, lo cual tendrá un efecto citotóxico y citostático para las células diana. Se produce en macrófagos, polimorfonucleares, músculo liso y endotelio vascular (36).

Si estudiamos el comportamiento de las isoformas de NOS en páncreas y en hígado nos encontraremos con que las isoformas constitutivas se comportan aquí de manera similar a cómo se comportan en otros tejidos. Sin embargo, en casos de R. I. I., se ha observado, que la iNOS aumenta tanto en tejido hepático como en pancreático. La explicación a esto parece estar relacionada con el hecho de que en el hígado existe un importante componente de sistema retículo-endotelial, mientras que el páncreas, por sí mismo, es una importante fuente de mediadores inflamatorios en situaciones de respuesta inflamatoria (35,36).

Existen numerosos elementos exógenos que producirán una inhibición de las isoformas de NOS, no habiéndose objetivado hasta el momento ninguna sustancia endógena que provoque esta inhibición.

Debido a que el NO es un radical libre, se unirá al oxígeno, dando lugar a dos productos principales: nitritos (NO_2) y nitratos (NO_3).

El NO actúa a diferentes niveles dentro del organismo, estando implicado en la fisiología del sistema cardiovascular y los mecanismos de hipertensión arterial (HTA), aterosclerosis e insuficiencia cardíaca, en la función gastrointestinal, neurológica, en procesos respiratorios y en el sistema inmune, entre otros. Entre sus muchos efectos, se ha observado una relación entre la producción de NO y la destrucción de islotes beta pancreáticos en el mecanismo fisiopatológico de la DM tipo 1.

A nivel del sistema inmunológico, su acción es inespecífica. Se ha observado la producción de pequeñas cantidades de NO en macrófagos residentes, aumentando la producción de éste de manera importante en macrófagos activados en la respuesta inmune in vivo o expuestos a la acción de citocinas in Vitro.

El TNF- α juega un papel muy importante en la respuesta contra las infecciones intracelulares producidas por microorganismos extracelulares como el hongo *Cryptococcus neoformans* o el parásito *Schistosoma mansoni*, ya que estimula la producción de NO (34).

Actualmente se sabe que el efecto sinérgico de IFN- γ y TNF- α induce la capacidad citotóxica del macrófago contra tumores y microorganismos al inducir la expresión de iNOS.

Las citocinas relacionadas con los linfocitos T helper 1 (Th1), como pueden ser la IL-2 y el IF- γ , estimulan macrófagos, produciéndose grandes cantidades de NO. Por el contrario, las citocinas relacionadas con los linfocitos T helper 2 (Th2), como la IL-4 o la IL-10, regulan negativamente la producción de NO, al igual que el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (34,36).

Existen asimismo mecanismos de neutralización del NO, como la producción de moléculas antioxidantes, entre las que se hallan la glutatión oxidasa, la glutatión peroxidasa, la catalasa y la superóxido dismutasa (34,35).

Monóxido de carbono y Hemooxigenasa

El monóxido de carbono (CO), es una molécula gaseosa que si bien puede ser muy tóxica para el organismo en grandes cantidades, se sabe que es producida por el metabolismo normal animal en pequeñas cantidades, estando implicada en varias funciones biológicas del organismo. Consiste en la unión mediante un enlace covalente doble de un átomo de carbono y uno de oxígeno.

El CO es producido de manera natural en el organismo por la acción de la Hemooxigenasa (HO), en sus dos isoformas, inducible, HO-1, y constitutiva, HO-2, a través de la degradación del grupo hemo. Este proceso producirá una cierta cantidad de carboxihemoglobina. Existe, además, una tercera isoforma, la HO-3, que no es catalíticamente activa (37,38).

Desde 1993, se reconoce al monóxido de carbono como un neurotransmisor, además de estar implicado en la modulación de la respuesta inflamatoria inespecífica. Considerado actualmente como un segundo mensajero involucrado en procesos de apoptosis, aterosclerosis, psoriasis, contracción vascular, protección celular e inflamación renal crónica, las alteraciones en su metabolismo propiciarán situaciones patológicas en relación a HTA, fallo cardíaco e inflamación, entre otros (38).

La HO es la principal enzima implicada en el catabolismo del grupo hemo, que dará lugar a la producción de biliverdina, hierro (Fe) libre y CO. La HO-2 es la isoforma constitutiva de la HO, la cual se producirá bajo condiciones homeostáticas, a diferencia

de la HO-1, isoforma que se aumentará considerablemente en presencia de hipoxia, hiperoxia, endotoxinas bacterianas, radiaciones ionizantes, citocinas, especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, metales pesados, factores de crecimiento, etc (39).

A la HO-1, conocida también como HSP-32 (*Heat shock protein-32*), se le atribuyen propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y anti-apoptóticas, estando además, implicada en numerosos procesos fisiopatológicos, tales como asma, aterosclerosis, miocardiopatías, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedades autoinmunes y rechazo de transplante de órganos y tejidos, entre otras (39).

En relación a procesos inflamatorios, se ha demostrado que la HO-1 previene del daño oxidativo a las células endoteliales y reduce la migración leucocitaria a través de la inhibición de la síntesis y liberación de mediadores inflamatorios, dentro de los que se incluyen radicales libres, agentes quimiotácticos y activadores celulares. Además, la inducción de la enzima disminuye la expresión de la molécula de adhesión intracelular (ICAM-1) endotelial y regula la generación de oxidantes intracelulares en células endoteliales, inhibiendo la adhesión leucocitaria generada por especies reactivas de oxígeno, además de inhibir hemoproteínas como la ciclooxygenasa y la iNOS en procesos inflamatorios. Respecto a la inhibición de la iNOS, ha sido demostrada en modelos experimentales realizados en macrófagos estimulados con endotoxinas bacterianas, en células epiteliales intestinales, en tejidos humanos y en células mesangiales glomerulares, así como en modelos de cirrosis en ratas. La HO-1, además, es capaz de regular la actividad de las citocinas. Estudiando el papel antioxidante de esta enzima, experimentos *in vivo* e *in vitro* han demostrado que ratones carentes de HO-1 mostraban más susceptibilidad a la producción de radicales libres y a la acumulación hepática y renal del Fe (39,40).

Existen resultados obtenidos *in vivo* e *in vitro* que nos permiten hablar sobre el efecto hepatoprotector de la HO-1. Por otra parte, la inhibición de la HO-1 provoca un aumento en los niveles de transaminasas, de malonilaldehído (MDA) y de los niveles de TNF- α , aumentando el daño oxidativo y los procesos inflamatorios (39).

En cuanto al papel que la HO-1 juega en el trasplante de órganos, se sabe que la inducción de esta enzima mejora el cuadro clínico del rechazo (41). La terapia génica con HO-1 proporciona una considerable protección contra el rechazo en el trasplante hepático en ratas, siendo capaz de inducir citocinas del patrón Th2 tales como IL-4 e IL-10 y eliminando la producción de Th1 en la fase postrasplante. En modelos de isquemia-reperfusión hepática se incrementa la supervivencia después de los trasplantes con la inducción de la HO-1. En modelos de trasplantes de islotes beta pancreáticos, tanto el CO como la inducción de la HO-1 produjeron protección de la apoptosis inducida por CD95/CD95L, al aumentar la supervivencia celular después de realizar el trasplante(39,41).

Por lo tanto, aunque aún están en estudio los mecanismos por los cuales la HO y el CO ejercen sus efectos, por ahora es seguro que éstos juegan un papel indispensable en el funcionamiento e integridad del organismo (38,39).

SEPSIS Y SHOCK SÉPTICO

Definiciones

La sepsis se define como aquella situación en la que aparece el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS), considerándose la causa del mismo un agente microbiano. El término SIRS apareció en la década de 1990, a mano de especialistas de

cuidados intensivos, pudiendo ser de etiología infecciosa o no, y considerando que éste se produce cuando aparecen al menos dos de los siguientes hallazgos:

- Fiebre (temperatura oral mayor de 38°C) o hipotermia (temperatura oral menor de 36°C)
- Taquipnea (más de 24 respiraciones/minuto)
- Taquicardia (más de 90 latidos/minuto)
- Leucocitosis (más de 12000 leucocitos/ μ l), leucopenia (menos de 4000 leucocitos/ μ l) o más de 10% de cayados.

Así, los signos que suelen indicar el inicio de una situación de sepsis suelen ser la fiebre o hipotermia, taquipnea y taquicardia. Cuando los mecanismos de control de contrarregulación se superan, la homeostasis puede fallar y pueden aparecer trastornos funcionales de órganos vitales, encontrándonos entonces ante una situación de sepsis grave, cursando con situaciones tales como acidosis metabólica, encefalopatía aguda, oliguria, hipoxemia o coagulación intravascular diseminada. Si se produce un nuevo desequilibrio regulador, entonces podrá producirse lo que conocemos como shock séptico, que se define como un cuadro de sepsis con hipotensión (tensión arterial sistólica menor de 90 mmHg o inferior a 40 mmHg respecto a la tensión arterial basal del paciente), que no responde a la reanimación con líquidos, sumándose la disfunción de órganos. A medida que la sepsis empeora y evoluciona hacia el shock séptico, el riesgo de muerte aumenta de forma sustancial (42).

Etiología

La sepsis es una respuesta ante microorganismos de cualquier clase. Para que ésta se desarrolle no es estrictamente necesario que se produzca una invasión microbiana en el torrente sanguíneo, ya que la propagación local o sistémica de las moléculas de señalización microbianas, o de las toxinas, igualmente pueden provocar esta respuesta. En casos de sepsis grave, suelen crecer bacterias u hongos entre el 20 y el 40% de los hemocultivos, aumentando hasta un 70% en casos de shock séptico. Las bacterias grampositivas o gramnegativas representan aproximadamente el 70% de los microorganismos aislados, correspondiendo el resto a hongos o poblaciones mixtas de microorganismos. Cuando existe un paciente con hemocultivo negativo, se suele identificar el agente etiológico a partir de un cultivo o estudio microscópico del material infectado de un foco local.

Algunas de las situaciones que predispondrán al desarrollo de bacteriemia por bacilos gramnegativos son la diabetes mellitus, las enfermedades linfoproliferativas, la cirrosis hepática, las quemaduras, los procedimientos o dispositivos invasivos y el tratamiento con fármacos causantes de neutropenia. Entre los factores de riesgo más importantes de bacteriemia por grampositivos se encuentran el cateterismo vascular, la presencia de dispositivos mecánicos permanentes, las quemaduras y el consumo de drogas por vía parenteral. La fungemia suele producirse en situaciones de inmunosupresión que cursan con neutropenia, a menudo después de recibir tratamiento con antimicrobianos de amplio espectro. En los pacientes con bacteriemia, algunos de los factores que aumentan el riesgo de desarrollar sepsis grave serán la edad mayor de cincuenta años y la presencia de un foco de infección primaria, ya sea pulmonar, abdominal o neuromeningeo. La bacteriemia provocada a

raíz de un catéter intravascular o en las vías urinarias tiene menos riesgo de producir sepsis grave (42,43).

Epidemiología

En la actualidad, la sepsis causa en Estados Unidos más de 100000 muertes anuales. La incidencia de sepsis grave y shock séptico ha sufrido un incremento en los últimos quince años, ascendiendo actualmente a una cifra de entre trescientos mil y quinientos mil casos cada año. Se estima que aproximadamente dos terceras partes de los casos se producen en pacientes hospitalizados por otras causas. El hecho del incremento de casos de sepsis grave en los países desarrollados es atribuible al envejecimiento de la población, a la mayor longevidad de pacientes con enfermedades crónicas y a la frecuencia relativamente alta de sepsis en los pacientes que sufren SIDA. También contribuirán a esto el uso generalizado de agentes antimicrobianos, glucocorticoides, catéteres permanentes y dispositivos mecánicos y uso de ventilación artificial (42).

Fisiopatología del shock séptico

La respuesta séptica suele producirse por la propagación de microorganismos procedentes del tubo digestivo o de la piel a los tejidos vecinos. Posteriormente, la infección localizada del tejido puede conducir a una bacteriemia o a una fungemia. Otra posibilidad es que los microorganismos se introduzcan directamente en el torrente sanguíneo. En términos generales la respuesta séptica se produce cuando un microorganismo invasor logra superar las defensas inmunitarias del huésped. Debido a que la mayoría de los casos están provocados por agentes que no causan

habitualmente enfermedad sistémica en huéspedes sanos, los déficits de factores no adaptativos del huésped pueden adquirir gran relevancia.

En situaciones de shock séptico en animales de experimentación, parece altamente implicado el NO, al cual ya nos hemos referido anteriormente, producido por la iNOS, que actuará como mediador del mismo. Sin embargo, se ha observado que roedores carentes del gen iNOS pueden ser sensibles al shock endotóxico. Otras moléculas importantes que actuarán de forma hipotensora serán la beta-endorfina, la bradisinina, el factor activador de plaquetas (PAF) y la prostaciclina. Los agentes que inhiben la síntesis o la acción de cada uno de estos mediadores pueden evitar o revertir el shock endotóxico en los animales. Sin embargo, en diversos ensayos clínicos ni un antagonista de los receptores del PAF ni un antagonista de la bradisinina mejoraron la tasa de supervivencia de pacientes con shock séptico, mientras que un inhibidor de la NOS, el clorhidrato de L-N^G-metilarginina, aumentó la tasa de mortalidad (42, 43).

Manifestaciones clínicas

Las manifestaciones de la respuesta séptica suelen superponerse a los síntomas y signos de la enfermedad subyacente y de la infección primaria del paciente. La respuesta sistémica a la infección suele intensificarse a lo largo del tiempo en caso de no intervenir, pasando de una situación de sepsis a una de sepsis grave, para dar finalmente un cuadro de shock séptico. La velocidad de esta progresión varía de forma individual entre unos pacientes y otros, al igual que la manifestación clínica del cuadro. Un ejemplo de esto es el caso de la fiebre, hallándose pacientes con temperatura

normal, especialmente en el caso de neonatos, ancianos, personas con uremia o enolismo.

A menudo, la hiperventilación es un signo precoz. Asimismo pueden aparecer diferentes manifestaciones de encefalopatía, como la desorientación o la confusión, sobre todo en ancianos o personas con alteraciones neurológicas previas. No son frecuentes los signos neurológicos focales, pero sí que se ha descrito de forma no tan infrecuente el agravamiento de déficit focales preexistentes.

La hipotensión y la coagulación intravascular diseminada predispondrán para la aparición de acrocianosis y necrosis isquémica de los tejidos periféricos, especialmente de los dedos. Cuando las bacterias o los hongos se diseminan por la piel o por los tejidos blandos subyacentes por vía hematógena, pueden aparecer celulitis, pústulas, flictenas o lesiones hemorrágicas. Asimismo, las toxinas bacterianas también pueden diseminarse por vía hematógena y desencadenar reacciones cutáneas difusas.

Manifestaciones gastrointestinales como náuseas, vómitos, diarrea o íleo, deben hacer sospechar un foco abdominal. Las úlceras de estrés pueden provocar cuadros de hemorragia digestiva alta. En ocasiones, la ictericia colestásica, con niveles elevados de bilirrubina sérica, que será en su mayor parte conjugada, y fosfatasa alcalina, aparece antes que otros signos de sepsis. Si la situación de hipotensión es intensa o prolongada puede provocar una necrosis isquémica del intestino.

En este tipo de situaciones, muchos tejidos pueden verse comprometidos a la hora de extraer oxígeno de la sangre, lo cual llevará a que se produzca un metabolismo anaerobio a pesar de la existencia de una situación de oxígeno venosa mixta prácticamente normal. Los niveles de lactato suelen ascender de forma precoz, en parte debido al aumento de la glucólisis en los tejidos periféricos, en parte por la

disminución del aclaramiento hepático y renal del lactato y piruvato resultantes. Según va disminuyendo el riego sanguíneo de los tejidos, la hipoxia tisular generará más ácido láctico, contribuyendo a que se desarrolle una acidosis metabólica. Muchas veces, se objetiva un aumento de la glucemia, especialmente en pacientes diabéticos, aunque el deterioro de la gluconeogénesis y la liberación excesiva de insulina pueden, en ocasiones, producir hipoglucemia. La respuesta de fase aguda mediada por las citocinas inhibirá la síntesis de albúmina y transtirretina y potenciará la producción de proteína C reactiva, proteína aglutinante a lipopolisacárido (LBP), fibrinógeno y componentes del complemento. Igualmente, es común que se produzca una marcada aceleración del catabolismo proteico (42, 44).

Complicaciones principales

Complicaciones cardio-pulmonares

En el inicio del proceso, se producirá un desequilibrio entre la ventilación-perfusión que dará lugar a una disminución de la presión parcial de oxígeno arterial (p_aO_2). El aumento de la permeabilidad capilar alveolar da lugar a un aumento del contenido de agua de los pulmones, lo cual disminuirá la distensibilidad pulmonar y dificultará el intercambio de oxígeno. La aparición progresiva de infiltrados pulmonares difusos y la hipoxemia en sangre arterial indican el desarrollo de un síndrome de distrés respiratorio, el cual aparecerá en aproximadamente el 50% de pacientes con sepsis grave o shock séptico. La insuficiencia de los músculos respiratorios puede agravar la hipoxemia y la hipercapnia.

La hipotensión que aparece de origen séptico suele deberse a una mala distribución generalizada del riego sanguíneo y del volumen de sangre y a una hipovolemia causada, en parte, por la extravasación capilar difusa del líquido intravascular. Otros factores que pueden reducir el volumen intravascular efectivo son la deshidratación secundaria a enfermedad previa o a las pérdidas insensibles de líquidos, los vómitos, la diarrea o la poliuria. Durante las primeras fases del shock séptico, la resistencia vascular sistémica suele encontrarse elevada y el gasto cardíaco puede estar disminuido, diferenciando este tipo de shock de otros tipos, como el cardiogénico, obstructivo extracardíaco e hipovolémico.

Se objetivará un aumento de los volúmenes telediastólico y sistólico ventriculares con descenso de la fracción de eyección, manifestaciones del deterioro de la función miocárdica, que aparecerá en las primeras veinticuatro horas en pacientes con sepsis grave. El gasto cardíaco se mantendrá a pesar de la baja fracción de eyección debido a que la dilatación ventricular permite que el volumen sistólico sea normal. Si el cuadro se resuelve, los pacientes experimentarán una normalización de la función miocárdica en unos días. Si bien es cierto que la disfunción miocárdica puede contribuir a la hipotensión, cuando está es resistente al tratamiento, suele deberse a la disminución de las resistencias vasculares sistémicas, por lo que la causa de éxito en estos pacientes no suele ser el trastorno funcional miocárdico, sino, más bien, el fracaso multiorgánico.

Complicaciones renales

Aparecen frecuentemente oliguria, hiperazoemia, proteinuria y cilindros urinarios inespecíficos. En muchos pacientes se da una poliuria inadecuada, que puede

verse favorecida aún más por la hiperglucemia. La hipotensión dará lugar a necrosis tubular aguda, lo cual propiciará insuficiencia renal, pudiendo producirse también glomerulonefritis, necrosis cortical renal o nefritis intersticial. Existen ocasiones en que ciertos fármacos utilizados en estos pacientes, como los aminoglucósidos cuando se administran existiendo hipotensión, pueden desencadenar una lesión renal.

Complicaciones de la coagulación

Se estima que presentan trombopenia entre un 10 y un 30% de los enfermos, si bien no se conocen adecuadamente los mecanismos que propician esta situación. En los pacientes que presentan coagulación intravascular diseminada pueden encontrarse cifras muy bajas de plaquetas, incluso inferiores a 50000/ μ l, lo que generalmente refleja una lesión endotelial difusa o una trombosis microvascular.

Complicaciones neurológicas

Aparecen cuando la situación de sepsis se prolonga en el tiempo, por semanas o meses, dándose una situación que se conoce como *la polineuropatía de la enfermedad crítica*, la cual puede impedir o dificultar la retirada del respirador y producir una debilidad motora distal (42).

Tratamiento

El tratamiento del shock séptico debe ser enérgico y a ser posible en una unidad de cuidados intensivos. El tratamiento debe ir encaminado a combatir la infección del foco local, proporcionar soporte hemodinámico y respiratorio y erradicar el microorganismo causal.

El tratamiento antimicrobiano debe iniciarse de forma precoz y empírica, tras la toma de muestras para cultivo, basándose en el conocimiento de los microorganismos patógenos más probables según su localización y teniendo en cuenta los patrones de sensibilidad antimicrobiana de los microorganismos aislados en la población, en el hospital y en el paciente. La terapia empleada debe cubrir de forma inicial bacterias grampositivas y gramnegativas, a la espera de los resultados de los cultivos, empleándose las dosis máximas recomendadas por vía endovenosa, ajustadas a la función renal particular de cada paciente. Una vez que se conozcan los resultados de los cultivos, el tratamiento debe de ser adaptado a éstos, pudiendo simplificarse en muchas ocasiones. Asimismo, es esencial eliminar o drenar el foco de infección primario, buscándose de forma minuciosa los lugares más probables para que anide una infección oculta (42).

La mayoría de pacientes requerirán de reposición agresiva de fluidos, durante las primeras 24 horas, sobre todo. Durante este período es importante una correcta monitorización de los parámetros de perfusión tisular, como el lactato sérico, la saturación central de oxígeno, la diuresis, etc. La reposición de volemia con sustancias como la albúmina o los cristaloides, se considera también segura y efectiva.

Dentro de límites razonables, se considera más importante la perfusión tisular que la presión sanguínea. En cualquier caso, durante el shock séptico, la autorregulación de la perfusión de los tejidos no ocurre de forma normal y ésta puede depender de forma lineal de la presión sanguínea. Así, después o de forma concomitante a la reposición inicial de fluidos, los paciente hipotensos pueden requerir la administración de vasopresores para mantener una presión sanguínea media mayor de 65 mmHg, para preservar de esta forma una adecuada perfusión tisular. Siempre

que sea posible, será preferible comenzar a utilizar fármacos vasopresores después de intentar el manejo con reposición de fluidos. Hoy por hoy no existe acuerdo sobre la superioridad de un agente sobre otro, aunque las guías clínicas aconsejan la utilización de noradrenalina o dopamina como primera opción. Además, en pacientes en los que se sospecha o se constata fallo de la función cardíaca, se administrará dobutamina como agente inotrópico (42, 44).

El nivel óptimo de hemoglobina para pacientes sépticos no ha sido determinado, aunque los estudios más recientes hablan de que cifras de hemoglobina entre 7-9 mg/dl serán suficientes cuando los parámetros de oxigenación tisular son los adecuados, aunque en casos de baja oxigenación tisular o pacientes con ciertas comorbilidades, como la enfermedad coronaria, los niveles de hemoglobina necesarios pueden oscilar entre 10-12 mg/dl. En cualquier caso, sobre este punto sigue existiendo controversia (44).

A principios de este siglo se publicaron varios trabajos en los que parecía que había una reducción en la morbi-mortalidad de pacientes con shock séptico, al ser tratados éstos con insulino terapia, para un correcto control glicémico. Sin embargo, con el tiempo, se ha visto que esto no así, estando este manejo actualmente contraindicado (45).

A lo largo del tiempo se han desarrollado diferentes terapias coadyuvantes, altamente controvertidas y sin resultados satisfactorios hasta el momento actual. Anticuerpos antiendotoxina han sido utilizados, como ES, HA-1 A y J-15, pero no se han obtenido buenos resultados clínicos en los estudios realizados, por lo que su uso se ha relegado. Otros tratamientos, como los anticuerpos monoclonales anti-TNF, agentes antiinflamatorios, corticoides, el uso de pentoxifilina, antioxidantes, etc. tampoco han

demostrado resultados concluyentes. Sí que parece beneficioso el uso de corticoides en casos de shock séptico e insuficiencia suprarrenal. En pacientes neutropénicos, el uso de factor estimulante de colonias de granulocitos mejora el resultado en el tratamiento de la sepsis, no siendo así en pacientes no inmunodeprimidos (46).

Por último, la proteína C es una molécula de elevado peso molecular, vitamina K dependiente, con un importante papel en la anticoagulación. Su forma activada, PCA, se encontrará muy disminuida en diferentes situaciones clínicas, que incluyen la sepsis grave, siendo en este caso un marcador de gravedad con valor pronóstico. Actualmente existe evidencia de que la terapia con PCA recombinante humana, la drotrecogina-alfa activada, es efectiva en el tratamiento de la sepsis en pacientes adultos en situación de sepsis grave con alto riesgo de mortalidad, siempre que se utilice junto con el resto de medidas terapéuticas que abordan los diferentes aspectos de la enfermedad (46, 47).

Implicaciones del hígado y del páncreas en situaciones de sepsis

El hígado es un órgano altamente implicado en la respuesta de fase aguda, la cual se basa en la producción de proteínas ante una agresión, como el traumatismo o la infección. La finalidad de esta respuesta es limitar el daño tisular, eliminar el agente etiológico del mismo, mantener las funciones vitales hepáticas y controlar los mecanismos de defensa. Esta respuesta es promovida por diferentes mediadores proinflamatorios, como la IL-1, la IL-6 los glucocorticoides y los factores de crecimiento. Las fuentes de producción de estas citocinas no se conocen totalmente, pero las células no parenquimatosas del hígado adyacentes a los hepatocitos parecen tener mayor implicación en la síntesis que éstos.

La IL-6, IL-1 β y el TNF- α son importantes inductores de la expresión de genes de proteínas de fase aguda en el hígado, modulando su expresión en el tejido hepático y regulando el rango de funciones biológicas en los órganos extrahepáticos (48).

El patrón de inducción de las proteínas de fase aguda puede ser dividido en dos grupos: los genes de proteínas de fase aguda tipo I y los genes de proteínas de fase aguda tipo II. Éstos se diferenciarán en que los primeros son estimulados por citocinas del tipo IL-1 y el segundo grupo será estimulado por citocinas del tipo IL-6. Se ha objetivado que la estimulación de genes del tipo I se verá a su vez potenciada por las citocinas del tipo IL-6, aunque no ocurre de la misma forma al contrario; en todo caso, se ha visto que cuando existe efecto por parte de la IL-1 sobre los genes de proteínas de fase aguda tipo II éste será inhibitorio (48).

Existen asimismo agentes inhibidores de la expresión de proteínas de fase aguda, como la prealbúmina, albúmina, transferrina, α_1 -lipoproteína y el factor XII de la cascada de coagulación, los cuales disminuirán durante la respuesta de fase aguda.

Es sabido que los glucocorticoides estimulan directamente la expresión de algunas proteínas de fase aguda, siendo su principal efecto la potenciación de la acción de las IL-1 e IL-6 sobre estas proteínas de fase aguda (27).

Las células de Kupffer representan la mayoría del tejido macrofágico y una importante fuente de mediadores de respuesta inflamatoria. Es bien conocido que la endotoxemia producirá un incremento en los niveles de plasma de mediadores de respuesta inflamatoria, así como en los receptores de estos mediadores. Debido a que la administración endovenosa de endotoxinas mayoritariamente se acumula en las células de Kupffer y que esta endotoxemia estimulará la producción de citocinas como IL-1 β y TNF- α en estas células aisladas, se ha postulado que el tejido macrofágico

mejora tanto la síntesis como la secreción de mediadores de fase aguda durante la respuesta inflamatoria.

Otro aspecto importante de la respuesta de fase aguda en el hígado es su resolución, la cual se producirá habitualmente en 24-48 horas, estando la IL-10 altamente implicada en este proceso (48).

El volumen de sangre que pasa a través del hígado humano es importante, constatándose 1500 ml/min, lo cual significa que el volumen completo de sangre corporal pasará a través del hígado 360 veces/día. Una vez en el hígado, los leucocitos tienen que pasar a través de los sinusoides hepáticos; el estrecho diámetro de los mismos y la baja velocidad a la que la sangre circula por ellos promoverán la interacción entre estos leucocitos y las células endoteliales sinusoidales, la cual, a diferencia de otros órganos, no tendrá que estar mediada por selectinas. Tanto las células endoteliales sinusoidales como las células de Kupffer son conocidas como importantes fuentes eliminadoras de antígenos, lo cual mediará la activación de la respuesta inmune. La acción dual de las células de Kupffer y las células sinusoidales serán sólo operativas bajo el control de mediadores locales (48).

El papel del hígado en la respuesta inmune y la patología relacionada con esto no ha sido bien explicada hasta el momento. Sí que se sabe que el entorno inmunológico del hígado está dominado por células relacionadas con la respuesta innata y no con la adaptativa (células NK, macrófagos, etc). Así, se puede asumir que la interacción de los agentes microbianos con células de sistema inmune innato pueden activar la respuesta inflamatoria inespecífica de forma local, lo cual producirá la inhibición del agente y ayudará a controlar la infección de forma local. Algunas de las

citocinas producidas en el hígado modificarán la distribución y migración de las células inmunes y activarán células de respuesta inmune inespecífica (27,48).

Vista anteriormente la alta implicación del hígado en la respuesta inflamatoria inespecífica, no es de extrañar que este órgano se vea afectado de forma importante en situaciones de sepsis y shock séptico, objetivándose en la mayoría de cuadros de sepsis la aparición de alteraciones funcionales hepatocelulares o canaliculares subyacentes, normalizándose las pruebas funcionales hepáticas tras la resolución de la infección. Si la situación de hipotensión es intensa o prolongada puede provocar una lesión hepática aguda (42).

El páncreas es un órgano que también aparece implicado en los mecanismos de respuesta inmune inespecífica, en relación a la producción de especies reactivas de oxígeno y de mediadores proinflamatorios (49).

Asimismo, se ha visto implicado en mecanismos de apoptosis, en relación a la identificación de proteínas proapoptóticas en sus células (50).

En casos de sepsis y shock séptico, se observará una distribución selectiva del flujo sanguíneo, con consecuencias negativas en el caso del páncreas, ya que derivado de este bajo flujo, se producirán situaciones de isquemia que darán lugar a cuadros de pancreatitis isquémica, lo cual contribuirá a la progresión de la sepsis y finalmente a la muerte. En general se ha visto que, en un contexto séptico, los hallazgos de daño pancreático aparecen de forma más precoz que en otros órganos, aun cuando el foco séptico no sea intraabdominal, lo cual se explica a partir de mecanismos de disfunción microvascular, que darán lugar a extensas áreas de isquemia, provocando la disfunción del órgano (51).

El aumento en la producción de citocinas, como, por ejemplo en TNF- α en los islotes de Langerhans se cree implicado en cuadros de hiperglicemia y en la patogénesis de la DM tipo 1 (52).

Es sabido que la producción endógena de NO afecta a la secreción endocrina y exocrina del páncreas en humanos, el cual en cantidades fisiológicas será beneficioso. Cuando la producción de este compuesto es excesiva, provocará la muerte celular mediante apoptosis y daño tisular. El aumento en la producción de iNOS durante un proceso inflamatorio, mediado por diferentes citocinas, dará lugar a cuadros diabetógenos por destrucción de islotes pancreáticos mediante mecanismos de apoptosis. Aunque se ha observado que la producción de NO dará lugar a daño sobre las células beta, se cree que este compuesto se formará en las propias células beta, pero también en los macrófagos pancreáticos, en las células ductales y en las células endoteliales. Diversos estudios han descrito que la inhibición de la iNOS protegerá contra la destrucción de islotes pancreáticos, evitando el cuadro de insulinitis derivado de ésta (53).

Resumiendo lo anterior, ambos, tanto el hígado como el páncreas, serán dos órganos altamente implicados en la respuesta inflamatoria inespecífica, ya sea por la importante producción de sustancias proinflamatorias en ambos tejidos, ya sea por cómo se verán afectados en situaciones en las que existe un estímulo proinflamatorio.

Hipótesis

Actualmente el FK-506 es considerado un importante fármaco con múltiples aplicaciones clínicas. Ha sido ampliamente estudiado en el tratamiento inmunosupresor del trasplante de órganos y se encuentra actualmente en estudio para otros muchos usos clínicos relacionados con patologías de base autoinmune, así como sus posibles efectos antiinflamatorios y antioxidantes.

La **hipótesis** que se plantea en este trabajo es que el efecto protector del FK-506 a dosis bajas sobre homogeneizados de tejido pancreático y hepático frente a la respuesta inflamatoria inespecífica se produce a través de un mecanismo antiinflamatorio, disminuyendo tanto la producción de mediadores inflamatorios inespecíficos como la aparición de estrés oxidativo.

OBJETIVOS

Objetivo general

Estudio del efecto del FK-506 a dosis bajas sobre la respuesta inflamatoria inespecífica y el estrés oxidativo en homogeneizados de tejido hepático y pancreático de rata, así como en plasma, previa estimulación con LPS.

Objetivos particulares

1. Estudio del efecto producido por el LPS al estimular tanto tejido pancreático como hepático en la producción de marcadores inespecíficos de inflamación, considerando para ello las concentraciones en los mismos de IL-1 y el TNF- α , así como sobre la aparición de estrés oxidativo, midiendo para este fin las

concentraciones de NOS en sus tres isoformas (eNOS, nNOS e iNOS) y HO en sus dos isoformas (HO-1 y HO-2).

2. Estudio del efecto del FK-506 a diferentes dosis (0.07, 0.15 y 0.30 mg/Kg) sobre los homogeneizados de hígado y páncreas estimulados previamente con LPS, observando modificaciones en los marcadores de respuesta inflamatoria inespecífica IL-1 y TNF- α .
3. Estudio del efecto del FK-506 a dosis de 0.07, 0.15 y 0.30 mg/Kg, en homogeneizados de hígado y páncreas que han sido estimulados con LPS, sobre marcadores de estrés oxidativo, midiendo para ello las concentraciones de eNOS, nNOS, iNOS, HO-1 y HO-2.
4. Estudio del efecto que produce la estimulación con LPS sobre los niveles plasmáticos de TNF- α , IL-1, CO y NO, así como tras la administración de FK-506 a tres dosis diferentes (0.07, 0.15 y 0.30 mg/Kg) en un modelo previamente estimulado con LPS.

Material y Métodos

1. ANIMALES

En este estudio se ha estudiado una n=30, utilizando para ello ratas Wistar macho de 250-300 g., las cuales han sido criadas bajo condiciones estándar de laboratorio. Todos ellas han recibido los cuidados necesarios, con acceso libre a agua y alimento, siguiendo las directrices de la Guía de la Unión Europea para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (Directiva de la Unión Europea 86/609/CEE para experimentos con animales). Los animales fueron previamente tratados una inyección intraperitoneal de FK-506 (0.07, 0.15 y 0.30 mg/Kg, Calbiochem Darmstadt, Alemania) o un vehículo (aceite de girasol), administrándoles 24 horas más tarde LPS intraperitoneal de Escherichia coli (10mg/ Kg; E5B55-LPS; Sigma-Aldrich; St. Louis- USA) o un vehículo (0.9% suero salino). Los animales fueron sacrificados 24 horas después de la administración de LPS mediante decapitación y fueron tomadas muestras de sangre. Sus hígados y páncreas fueron extraídos y procesados según lo que se explica a continuación.

2. HOMOGENEIZADOS DE TEJIDO

Los tejidos fueron disecados y congelados en hielo seco. Las muestras de órganos fueron pesadas y transferidas a tubos de 50 ml de polipropileno (Falcon; Becton Dickinson, Lincoln Park, NJ) que contenían buffer de lisis a 4º C (10mL/1g buffer/ wet tissue ratio). El buffer de lisis consistía en 1 mM de fluroruro de fenilmetilsulfonil (PMSF; Sigma Chemical Company) y 1 µg/ml de pepstatina A (Sigma Chemical Company), aprotinina (Sigma Chemical Company) y leupeptina (Sigma Chemical Company) en una solución tamponadora de fosfato a pH 7.2 (Biofluids, Rockville, Md) que contenía 0.05% de azida sódica (Sigma Chemical Company). Las

muestras fueron homogeneizadas (velocidad máxima 30 s) tres veces (Polytron; Brinkmann Instruments, Westminster, NY) e inmediatamente congeladas en nitrógeno líquido. Los homogeneizados de tejido fueron posteriormente descongelados en un baño de agua a 37 °C y centrifugados a 119,000 g (1h, 4 °C) a fin de separar las organelas celulares. Los sobrenadantes fueron congelados a – 80 °C para permitir la formación de agregados macromoleculares. Después de descongelar los agregados a 4 °C, éstos fueron centrifugados de nuevo a 3000 g (4 °C) y el volumen final de órgano homogeneizado fue medido con una pipeta graduada.

3. PARÁMETROS A MEDIR

a) Expresión tisular de IL-1, TNF- α , HO-1, HO-2, iNOS, eNOS y nNOS en los homogeneizados de tejido.

La técnica Western blots (WB) ha sido utilizada para medir la expresión de proteínas de las isoformas de la NOS y de la HO, así como de TNF- α e IL-1.

Muestras de 50-60 mg de homogenizado de tejido fueron hervidas con un buffer de carga tipo gel (0.100 M Tris-Cl; 4% SDS; 20% glicerol; 0.1% bromofenol azul; ratio 1:1) y tratadas con un baño de ultrasonidos. Para corregir posibles variaciones en el tamaño de las muestras se determinó la concentración de las proteínas por el método de Bradford. Las proteínas totales de cada muestra (25 μ g) fueron separadas mediante SDS-PAGE usando geles de acrylamida al 10% y fueron transferidas mediante un sistema semi-seco a la

membrana de nitrocelulosa. La membrana de nitrocelulosa es rápidamente introducida con un buffer que contiene un 5% de leche desnatada en 20 mM Tris, a pH 7.5, 150 mM de cloruro sódico y 0.01% de Tween-20. La muestra se incubó a 37 °C durante una hora. La membrana fue incubada con anticuerpo policlonal de conejo anti-rata para TNF- α , IL-1, eNOS e iNOS (1:1000) durante dos horas a 25-27 °C, seguido de otra incubación con anticuerpo equino conjugado anti-peroxidasa murino (1:2000). Lo mismo se realizó para HO-1 y HO-2. Después de ser lavadas con T-TBS, las membranas son incubadas con ECL Plus Western Blotting Detection Reagents (Amersham Life Science Inc.), Buckinghamshire, UK), expuestos a un film de rayos X. Los films fueron escaneados con un densitómetro (BioRad GS 800) para determinar las densidades ópticas relativas. Marcadores de proteínas previamente teñidos fueron utilizados para las determinaciones de peso molecular.

b) Niveles plasmáticos de NO, CO, IL-1 y TNF- α

Las concentraciones plasmáticas de nitrito y nitrato fueron medidas como parámetros indirectos de valoración de NO tras la reducción de NO₃ a NO₂. Las muestras fueron desproteinizadas mediante la adición de ácido sulfosalicílico, incubadas durante 30 min a 4 °C y posteriormente centrifugadas (12000 g, 20 min). Después de incubar los sobrenadantes con NO₃ reductasa de E. Coli (37 °C, 30 min), se añadió 1 mL de reactante de Griess (0.5% de dihidrocloruro de

naftilenediamina, 5% de sulfonamida y 25% de H_3PO_4). La reacción se produjo a 22°C durante 20 min, y la absorbancia de 546 nm fue medida usando una solución de NaNO_2 . La señal medida es lineal de 1 a 150 μM ($r = 0.994$, $P < 0.001$, $n = 5$), y el umbral de detección es aproximadamente de 2 μM .

Para cuantificar la cantidad de CO, el ratio de carboxihemoglobina fue medido tras la adición de hemoglobina. Se añadieron 4 μM de hemoglobina a las muestras y la mezcla se mantuvo en reacción durante 1 min, asegurando la máxima unión con el CO. Las muestras fueron posteriormente diluidas con una solución que contenía buffer fosfato (0.01 mol/L de fosfato potásico monobásico/ fosfato potásico dibásico), a pH 6.85) y ditionito sódico. La absorbancia fue medida a 420 y 432 nm. La reproducibilidad entre los ensayos se evaluó en tres experimentos independientes, y cada ensayo se repitió tres veces. El coeficiente total de variación intra-ensayo se ha calculado <5%. El coeficiente total de variación inter-ensayo se ha calculado < 6%.

Finalmente, los niveles plasmáticos de citocinas ($\text{TNF-}\alpha$ e IL-1) fueron determinados mediante un kit comercial de ELISA (Oncogene Research Products; San Diego, CA, USA).

4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se han expresado como medias \pm SEM de al menos seis experimentos independientes. La comparación de las medias se ha realizado utilizando

el análisis de la varianza (ANOVA), método que prueba la igualdad entre tres o más medias poblacionales analizando las varianzas de las medias, o el test Kruskal-Wallis cuando se detectó que no existía homogeneidad entre los grupos. Hemos considerado resultados significativos a partir de un nivel de confianza del 95%. El análisis estadístico fue llevado a cabo con el programa Satgraphics Plus 5.1 (Statpoint Inc., USA) para Microsoft Windows.

APÉNDICE

Técnica de Western Blots (WB)

El Western Blots, o inmunotransferencia, es una técnica basada en una electroforesis de proteínas en geles de acrilamida y su posterior transferencia a un soporte sólido (papel de nitrocelulosa, nylon). La identificación de las proteínas a estudiar se realiza por incubación de la membrana o soporte con anticuerpos específicos marcados con enzimas o isótopos radiactivos (54).

Más detalladamente, inicialmente, en esta técnica, se separan las proteínas de la muestra mediante electroforesis en un gel de SDS-poliacrilamida. A continuación, estas proteínas se transfieren a una membrana de nitrocelulosa en el interior de una cámara de transferencia. Después de esto se añadirá a la membrana un anticuerpo específico para el antígeno que nos interesa estudiar, al que se ha unido una enzima. Posteriormente se lava para retirar el anticuerpo sobrante. Añadiendo un cromógeno capaz de cambiar el color en presencia de la enzima, podremos detectar en la membrana la presencia de las bandas que corresponden al antígeno que nos interesa detectar (55).

ECL Plus Western Blotting detection Reagents fue el primer sistema de reactivos quimioluminiscentes comercializado para Western Blotting, siendo aún en la actualidad el más ampliamente utilizado (56).

Método de Bradford

Se trata de un método colorimétrico descrito por Bradford en 1976. El fundamento de este método es la unión del Azul brillante de Coomassie a las proteínas. Esta unión produce un desplazamiento de la absorbancia máxima del colorante de 465 a 595 nm. Se mide la absorbancia de las muestras a esta última longitud de onda frente a una curva patrón conocida (57).

Sistema SDS-PAGE

El sistema SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, se trata de un tipo de electroforesis en la que las muestras se desnaturalizan por calor en presencia de agentes desnaturalizantes (beta-mercaptoetanol, que destruye los puentes disulfuro, SDS que desnaturaliza y recubre a la proteína) y se separan como cadenas polipeptídicas aisladas (58).

Reacción de Griess

La reacción de Griess se trata de una prueba química utilizada para detectar la presencia de nitritos orgánicos. El nitrito es detectado y analizado por la formación de un color rosado cuando se trata una muestra que contiene nitrito con el reactivo de Griess, el cual contiene diclorhidrato de naftiléndiamina y sulfanilamida en ácido

fosfórico. Cuando se adiciona ácido sulfanílico a la muestra, los nitritos forman una sal de diazonio, que al añadir α -naftilamina dará un color rosado (59).

Método ELISA

El enzimoimmunoensayo o ELISA permite identificar inmunocomplejos por medio de enzimas unidas al antígeno o anticuerpo, estando uno de ellos adsorbido a un soporte sólido, que habitualmente será una placa de poliestireno. La reacción antígeno-anticuerpo se detecta mediante la utilización de una enzima conjugada químicamente al antígeno o anticuerpo. Añadiendo el sustrato adecuado, esta enzima convertirá un sustrato incoloro en un producto coloreado, cuyo color es proporcional a la cantidad de inmunocomplejos formados. Esta técnica es muy sensible y permite analizar muchas muestras de forma simultánea. Dentro de esta técnica, existen diferentes variantes:

- ELISA competitivo: basado en la competición establecida entre un antígeno a cuantificar y concentraciones conocidas del mismo antígeno, marcado con una enzima, por unirse al anticuerpo correspondiente que se ha fijado al soporte sólido. A mayor cantidad de antígeno en la muestra, mayor cantidad de antígeno marcado se unirá al soporte.
- ELISA de inhibición: también se trata de un análisis competitivo, pero en este caso se une una cantidad fija de antígeno a la fase sólida. La inhibición se lleva a cabo cuando se incuba una concentración fija de anticuerpo conjugado frente a una serie de diluciones de la muestra que contiene el anticuerpo a cuantificar.
- ELISA no competitivo/sándwich: se utilizan dos anticuerpos, el primario, unido a la fase sólida, y el secundario, unido a la enzima, los cuales se unirán a

epítopos diferentes del antígeno. Tras añadir la muestra que contiene el antígeno a concentraciones variables, se incuba con el anticuerpo secundario o conjugado (específico de antígeno). El sistema es adecuado para utilizar anticuerpos monoclonales que pueden diferenciar epítopos en un mismo antígeno (55).

Resultados

EXPRESIÓN TISULAR DE MEDIADORES ENDÓGENOS Y MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO

1. Expresión de mediadores en tejido (Figura 3)

a. TNF- α

i. PÁNCREAS

1. Cuando añadimos LPS a un grupo control, se observa que la concentración de TNF- α aumenta de manera significativa.
2. Si en el grupo que ha sido previamente estimulado con LPS, medimos la concentración de TNF- α tras añadir FK-506 a concentraciones de 0.07 mg/Kg, 0.15 mg/ Kg y 0.3 mg/ Kg se objetiva que en el primer caso y el segundo, la concentración de TNF- α no disminuye significativamente, existiendo una disminución significativa en el tercer caso.
3. Se observa que en ninguno de los tres grupos a los que se ha añadido FK-506, las concentraciones de TNF- α han alcanzado las cifras del grupo control. Es decir, la respuesta obtenida con FK a dosis máximas es parcial.

ii. HÍGADO

1. El LPS hace que el TNF- α aumente de manera significativa en el tejido hepático.
2. Al añadir FK-506 a concentración de 0.07 mg/Kg, la concentración de TNF- α se reduce de manera

significativa, existiendo también reducción de concentración de TNF- α significativa con FK-506 a concentraciones de 0.15 mg/Kg y 0.30 mg/ Kg.

3. Tanto al añadir FK-506 a 0.15 mg/Kg como a 0.30 mg/Kg, los valores de TNF- α revierten completamente, siendo su concentración equiparable a la del grupo control.

b. IL-1

i. PÁNCREAS

1. Al añadir LPS a un grupo control, se observa un aumento de la concentración de IL-1, siendo dicho aumento estadísticamente significativo.
2. Si comparamos el grupo estimulado con LPS con tres grupos diferentes estimulados con LPS a los que además se les ha añadido FK-506 a concentraciones de 0.07 mg/Kg, 0.15 mg/Kg y 0.3 mg/Kg objetivamos que la concentración de IL-1 disminuye significativamente en todos los grupos.
3. Se observa que la concentración de IL-1 sólo alcanzan cifras similares a la concentración del grupo control cuando a un grupo previamente estimulado con LPS se le añade FK-506 a 0.3 mg/Kg, no siendo así en los grupos tratados con FK-506 a concentraciones de 0.07 mg/Kg ni 0.15 mg/Kg.

ii. HÍGADO

1. Si comparamos el grupo control con uno que se ha estimulado con LPS, se observa que la concentración de IL-1 aumenta de manera significativa.
2. Cuando lo que comparamos es el grupo sólo estimulado con LPS con tres grupos a los que además de LPS se ha añadido FK-506 a concentraciones de 0.07, 0.15 y 0.3 mg/Kg observamos que en estos tres últimos la concentración de IL-1 se reduce de manera significativa.
3. Se observa que sólo en el grupo estimulado con LPS al que se ha añadido FK-506 a 0.3 mg/Kg se alcanzan valores en la concentración de IL-1 similares al de la muestra control, no siendo así en los grupos con FK-506 a 0.07 y 0.15 mg/kg.

2. Expresión tisular de las diferentes isoformas de Hemooxigenasa en tejidos (Figura 4)

a. Hemooxigenasa-1

i. PÁNCREAS

1. Si comparamos el grupo control con un grupo estimulado con LPS, observamos que la concentración de HO-1 aumenta de manera significativa.
2. Al añadir a tres grupos estimulados con LPS, FK-506 a concentraciones de 0.07 mg/Kg, 0.15 mg/Kg y 0.3 mg/ Kg

se observa una disminución significativa de la concentración de HO-1 en los tres casos, siendo las diferencias entre el grupo estimulado con LPS y los que tienen FK-506.

3. Comparando el grupo control con los que se ha añadido FK-506 se objetiva que sólo en los que la concentración de éste es de 0.15 y 0.03 mg/Kg las cifras de HO-1 se igualan con el primero.

ii. HÍGADO

1. Al medir la concentración de HO1 en el grupo control y uno al que se ha añadido previamente LPS, se observa que el nivel de HO-1 ha aumentado significativamente en el segundo grupo.
2. Si comparamos el grupo estimulado con LPS con grupos a los que, además de LPS, añadimos FK-506 a concentraciones crecientes de 0.07 mg/Kg, 0.15 mg/ Kg y 0.03 mg/Kg, obtenemos una disminución significativa de la concentración de HO-1 en el tejido en todos los casos.
3. Se observa que en el grupo en el que se ha añadido FK-506 a 0.15 y 0.30 mg/Kg las cifras de HO-1 han revertido hasta valores similares a los que se encontraban en el grupo control, o más bajos, en el caso de FK-506 a 0.30 mg/ Kg, no siendo así para el grupo con concentraciones de FK-506 de 0.07 mg/ kg.

b. Hemooxigenasa-2

i. PÁNCREAS

1. Se observa un aumento estadísticamente significativo entre la concentración de HO-2 en tejido pancreático en el grupo control y entre el que es estimulado con LPS.
2. Cuando tratamos grupos que han sido previamente estimulados con LPS con FK-506 a concentraciones de 0.07 mg/Kg, 0.15 mg/Kg y 0.03 mg/ Kg no se hallan diferencias significativas entre la concentración de HO-2 en éstos y en el grupo al que se ha añadido LPS exclusivamente.
3. En ninguno de los grupos tratados con FK-506 los valores de la concentración de HO2 revierte al valor inicial que presentaba en el grupo control.

ii. HÍGADO

1. Existe aumento significativo en la concentración de HO-2 en tejido hepático entre el grupo control y el estimulado con LPS.
2. Cuando se añade FK-506 a concentraciones de 0.07 mg/Kg, 0.15 mg/ Kg y 0.3 mg/Kg a grupos previamente estimulados con LPS se observa una disminución significativa en la cifra de HO-2 con las dos concentraciones más altas.

3. En los grupos a los que se ha añadido FK-506 a 0.15 mg/Kg y 0.3 mg/ Kg, la cifras de HO-2 se igualan a la del grupo control, no siendo así en el grupo tratado con FK-506 a 0.07 mg/Kg.

3. Expresión tisular de las diferentes isoformas de Óxido Nítrico Sintasa (Figura 5)

a. Óxido nítrico sintasa inducible

i. PÁNCREAS

1. Cuando estimulamos con LPS, se observa que la expresión de iNOS aumenta significativamente respecto al grupo control.
2. En el grupo estimulado con LPS, al añadir FK-506 a concentraciones crecientes de 0.07 mg/Kg, 0.15 mg/Kg y 0.3 mg/ Kg, observamos que en el primer grupo la cifra de iNOS no presenta cambios respecto al grupo estimulado con LPS, en el segundo grupo la concentración de iNOS aumenta significativamente y en el tercer grupo la concentración de iNOS disminuye significativamente.
3. De los grupos estimulados con LPS a los que se ha añadido FK-506 sólo en aquel con concentraciones de éste a 0.3 mg/dl la concentración de iNOS es igual a la del grupo control.

ii. HÍGADO

1. Se evidencia un aumento en la concentración de iNOS en tejido hepático estimulado con LPS respecto al grupo control.
2. Observando tres grupos que han sido estimulados con LPS y a los que posteriormente se ha añadido FK-506 a concentraciones de 0.07 mg/Kg, 0.15 mg/ Kg y 0.3 mg/Kg se objetiva que existe una disminución significativa en la concentración de iNOS respecto al grupo estimulado con LPS.
3. En el grupo estimulado con LPS al que se ha añadido FK-506 a 0.3 mg/Kg la concentración de iNOS revierte a cifras similares a las que presentaba en el grupo control, no siendo así para los grupos con FK-506 a 0.07 mg/Kg y 0.15 mg/Kg.

b. Óxido nítrico sintasa endotelial

i. PÁNCREAS

1. Cuando comparamos un grupo control con un grupo al que se le ha añadido LPS, no hallamos una diferencia significativa en las concentraciones de eNOS.
2. Si a tres grupos que han sido estimulados con LPS les añadimos FK-506 a concentraciones de 0.07 mg/ kg 0.15 mg/kg y 0.30 mg/ Kg, observamos que no existe

diferencia en la concentración de eNOS entre el grupo estimulado con LPS y a los que se administra FK-506 a 0.07 mg/ Kg y a 0.15 mg/ Kg, hallando un aumento significativo en la concentración de eNOS para el grupo al que se le ha añadido FK-506 a 0.30 mg/Kg.

3. Si comparamos el grupo control con los tres a los que se ha añadido FK-506, sólo encontramos una diferencia significativa con el que lleva FK-506 a 0.3 mg/Kg, hallándose en este caso la eNOS aumentada respecto al grupo control.

ii. HÍGADO

1. No se halla diferencia significativa en la concentración de eNOS hepática entre un grupo control y uno estimulado con LPS.
2. La adición de FK-506 genera un aumento significativo de la expresión de eNOS en comparación con el grupo control independientemente de la dosis y frente al grupo estimulado con LPS al emplear dosis de 0.07 y 0.3 mg/Kg.

c. **Óxido nítrico sintasa neuronal**

i. PÁNCREAS

1. No se halla diferencia significativa entre la concentración de nNOS en el grupo control y en uno estimulado con LPS.

2. Tampoco hallamos diferencias significativas de la concentración de nNOS entre el grupo estimulado con LPS y tres grupos estimulados con LPS a los que se añade FK-506 a concentraciones de 0.07 mg/kg, 0.15 mg/Kg y 0.3 mg/Kg. Se observa una disminución significativa en la concentración de nNOS en el grupo estimulado con LPS y tratado con FK-506 a dosis máximas y el grupo control.

ii. HÍGADO

1. Se observa una disminución significativa en la concentración de nNOS entre el grupo control y el estimulado con LPS.
2. También se observan diferencias significativas entre el grupo tratado con LPS y tres grupos a los que se ha añadido FK-506 a concentraciones de 0.07 mg/kg, 0.15 mg/Kg y 0.30 mg/Kg, hallándose una disminución en la concentración de nNOS para estos tres grupos.
3. También se halla disminución significativa en la concentración de nNOS en los grupos tratados con FK-506 respecto al grupo control.

CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE MEDIADORES ENDÓGENOS Y MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO (Figura 6)

1. TNF- α

1. Se observa un aumento significativo en los niveles plasmáticos de TNF- α tras la estimulación con LPS
2. Observamos una disminución significativa de los niveles plasmáticos de TNF- α tras la administración de FK-506 a cualquier dosis (0.07, 0.15 y 0.30 mg/Kg), previa estimulación con LPS, respecto al grupo sólo tratado con LPS.
3. Comparando los grupos estimulados con LPS y tratados con FK-506 a las tres dosis descritas, respecto al grupo control, observamos que los grupos tratados con FK-506 a dosis de 0.15 y 0.30 mg/Kg alcanzan cifras similares al grupo control

2. IL- 1

1. Observamos un aumento significativo en los niveles plasmáticos de IL-1 tras la estimulación con LPS.
2. Se observa que existe una disminución significativa de los niveles plasmáticos de IL-1 en los grupos tratados con FK-506 a dosis de 0.07, 0.15 y 0.30 mg/Kg respecto al grupo sólo tratado con LPS.
3. Ninguno de los grupos que habían sido estimulados con LPS y tratados con FK-506 alcanza las cifras de IL-1 en plasma del grupo control.

3. NO

1. Se objetiva un aumento significativo en los niveles de NO en plasma, al estimular un grupo con LPS, respecto al grupo control.

2. Cuando se tratan grupos previamente estimulados con LPS con FK-506 a dosis de 0.07, 0.15 y 0.30 mg/Kg se observa que existe una disminución significativa de los niveles plasmáticos de NO.
3. Los grupos tratados con dosis de 0.15 y 0.30 mg/Kg de FK-506 presentan niveles plasmáticos de NO similares a los del grupo control.

4. CO

1. Existe un aumento significativo en los niveles de CO en plasma al estimular un grupo con LPS respecto a un grupo control.
2. Cuando se tratan grupos estimulados con LPS con FK-506 a dosis de 0.07, 0.15 y 0.30 mg/Kg, observamos que en los tres casos existe un descenso significativo de los niveles de CO.
3. Comparando con el grupo control, los grupos tratados con FK-506 a dosis de 0.15 y 0.30 mg/Kg presentan cifras plasmáticas de CO similares a éste.

Figura 3

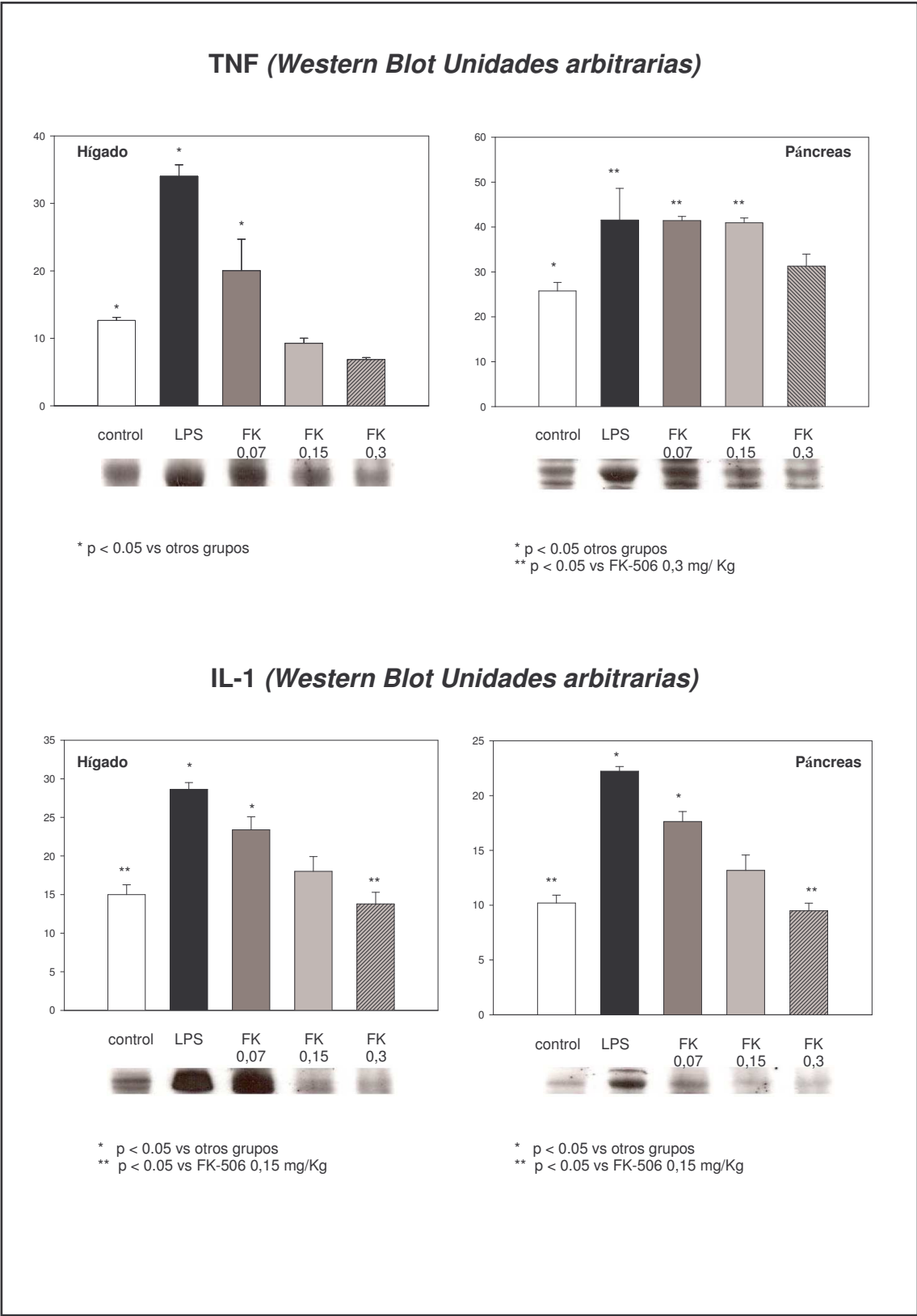
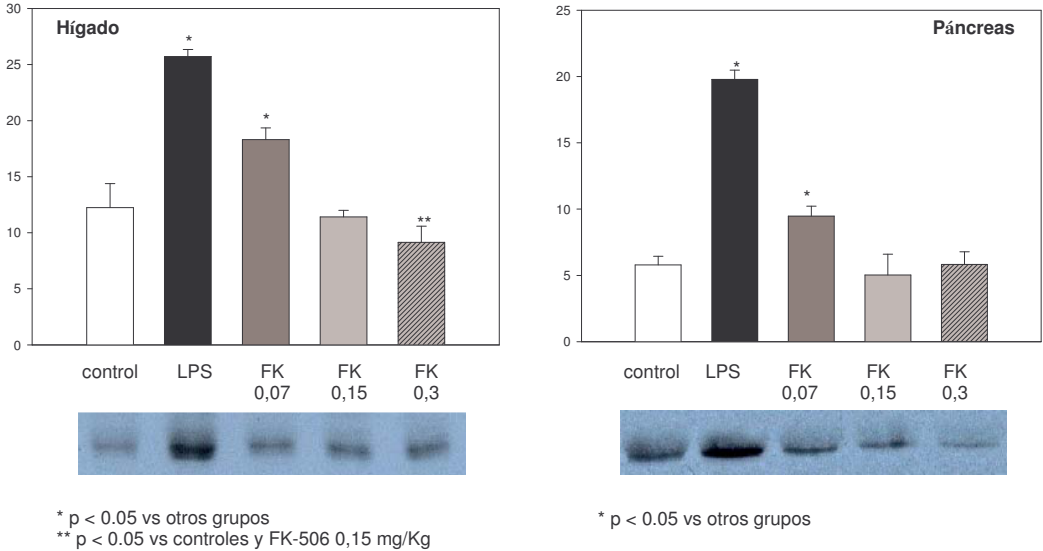


FIGURA 3. Modulación de la expresión de TNF- α e IL-1 tras la administración de FK-506 en tejido hepático y pancreático expuesto a LPS. Las barras indican los valores tisulares hepático y pancreático de IL-1 y TNF- α determinados por Western blot tras la estimulación con LPS a través de inyección intraperitoneal del mismo (10 mg/Kg; *Escherichia coli* E5SB55) en ratas Wistar tratadas o no previamente con FK-506 (dosis 0.07, 0.15 y 0.3 mg/Kg). Cada barra representa medias y SEM medidos en al menos seis animales en cada grupo. (a) La administración de FK-506 disminuye el aumento en la expresión de TNF- α tras la estimulación con LPS con un patrón dosis-respuesta (* p <0.05 vs. los otros grupos). (b) La expresión pancreática de TNF- α se vio aumentada tras la estimulación con LPS. El FK-506 produjo una disminución en la expresión de la misma con una tendencia dosis-respuesta (* p <0.05 vs el grupo con FK-506 a 0.3 mg/Kg). (c y d) El incremento de IL-1 en tejido hepático y pancreático tras la inyección de LPS fue disminuido en todos los grupos tratados con FK-506, alcanzando los valores del grupo control cuando la dosis más alta de inmunosupresor fue utilizada (* p < 0.05 vs resto de grupos; ** p <0.05 vs grupo con FK-506 a 0.15 mg/Kg)

Figura 4

Hemoxygenasa-1 (Western Blot Unidades arbitrarias)



Hemoxygenasa-2 (Western Blot Unidades arbitrarias)

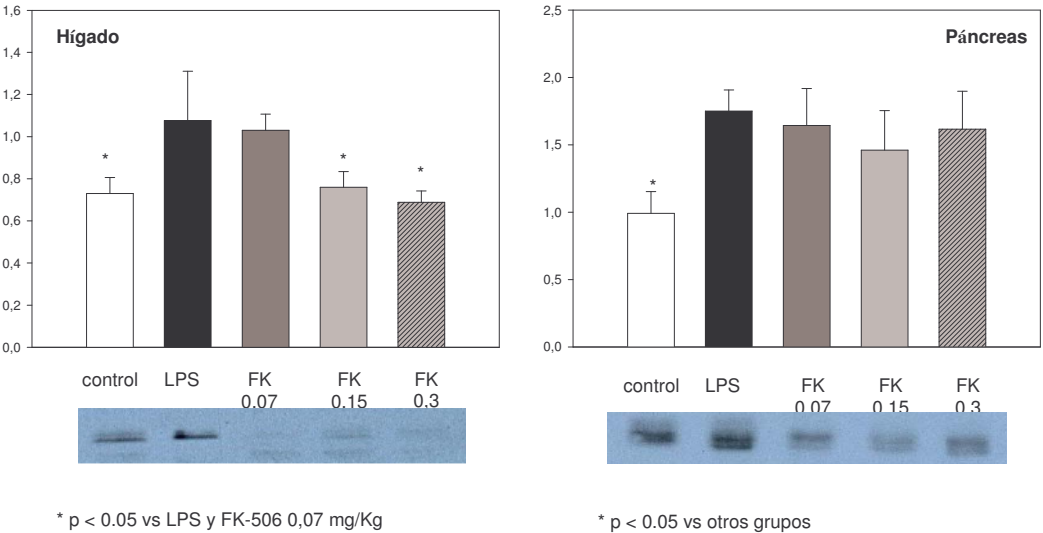
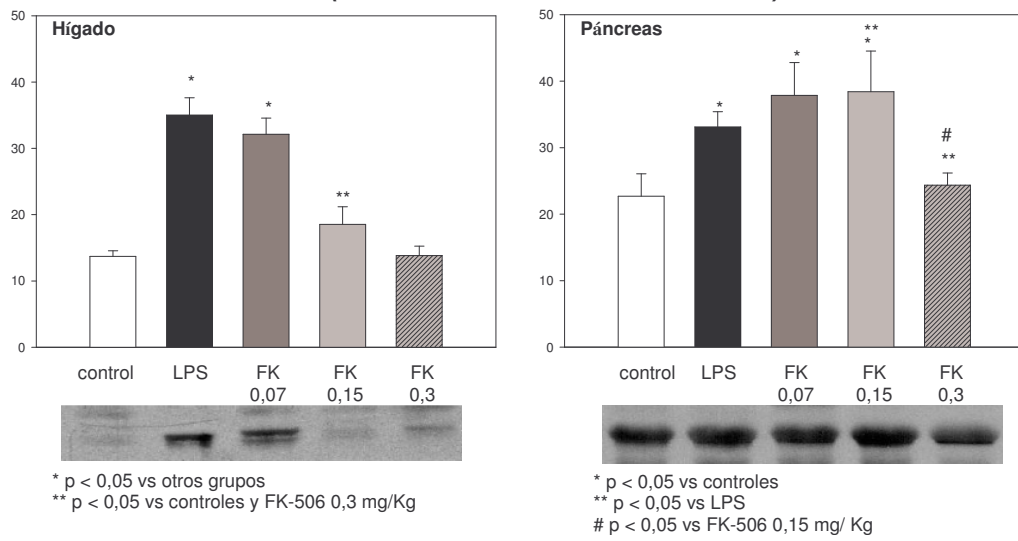


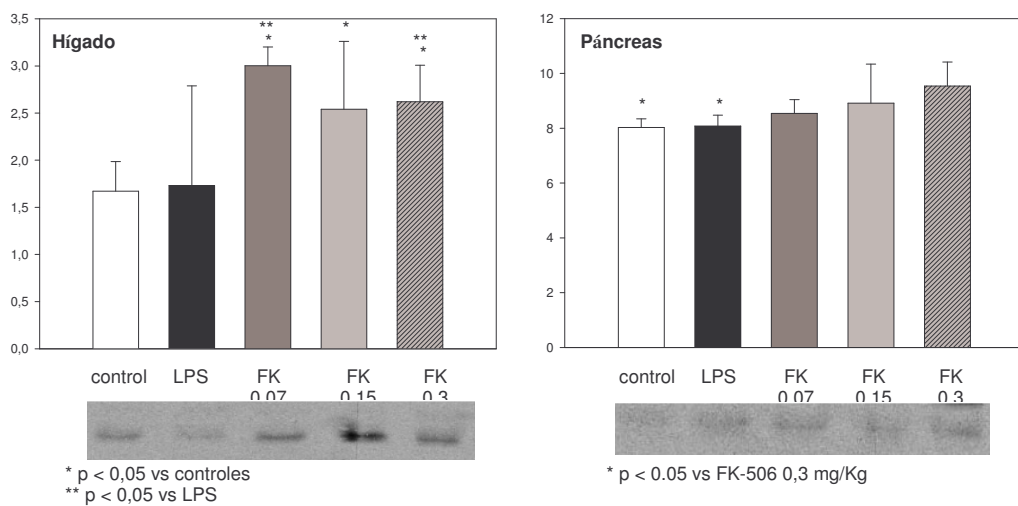
FIGURA 4. Modulación de las isoformas de HO tras el tratamiento con tacrolimus. El FK-506 disminuyó tanto la expresión de HO-1 y la HO-2 hepáticas y la HO-1 pancreáticas, que se encontraban incrementadas tras la estimulación con LPS. Las barras muestran la expresión de las isoformas de la HO en hígado y en páncreas (medias y SEM), medidas por Western Blot en ratas Wistar tratadas con LPS (10 mg/Kg; *Escherichia coli* E5B55) en presencia o ausencia de FK-506 (0.7, 0.15 o 0.30 mg/Kg) sacrificadas 24 h después de la inyección de endotoxina. Cada barra representa los resultados en grupos de n=6. (a) Los niveles de HO-1 fueron significativamente mayores en animales estimulados con LPS. El FK-506 disminuyó el incremento de esta isoenzima con una tendencia dosis-respuesta (*p<0.05 vs. el resto de grupo; **p<0.005 vs. grupo control y grupo con FK-506 a dosis de 0.15 mg/Kg). (b) La expresión de HO-1 mostró un incremento importante después de la estimulación con LPS. La administración de FK-506 reduce la expresión de la enzima, alcanzando los niveles del grupo control al emplear dosis de 0.15 y 0.3 mg/Kg de FK-506 (*p<0.05 vs. el resto de grupos). (c) La expresión en tejido hepático de HO-2 aumentó significativamente cuando se administró LPS, alcanzando los niveles basales al aplicar dosis de FK-506 de 0.15 y 0.3 mg/Kg (*p<0.05 vs. grupo con LPS y grupo con FK-506 a 0.07 mg/Kg). (d) El incremento de HO-2 inducido por el LPS no fue modificado con el tratamiento con FK-506 (*p<0.005 vs. el resto)

Figura 5

iNOS (Western Blot Unidades Arbitrarias)



eNOS (Western Blot Unidades arbitrarias)



nNOS (Western Blot Unidades arbitrarias)

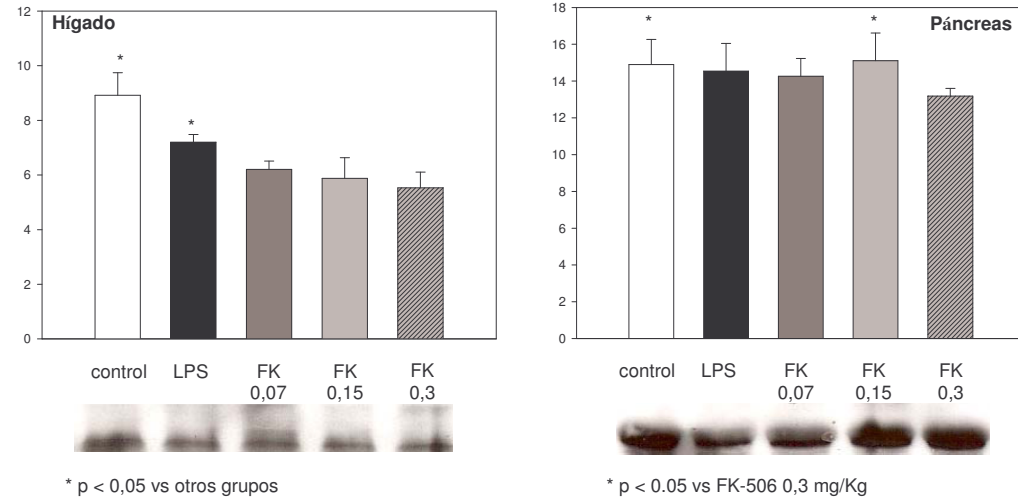


FIGURA 5. Modulación de las isoformas de NOS tras el tratamiento con tacrolimus. Las gráficas representan la evaluación de las isoformas de NOS tanto en hígado como en páncreas de ratas Wistar tras la administración de una inyección intraperitoneal de LPS (10 mg/Kg; *Escherichia coli* E5B55) en la presencia y ausencia del tratamiento con FK-506 (dosis 0.7, 0.15 y 0.3 mg/Kg) determinadas mediante el método de Western blot. Cada barra representa la media y SEM en al menos seis animales. (a) La expresión de iNOS aumenta marcadamente tras la estimulación con LPS, alcanzando los niveles del grupo control al administrar dosis de FK-506 de 0.3 mg/Kg (* $p < 0.05$ vs. el resto; ** $p < 0.05$ vs. grupo control y grupo con dosis de FK-506 a 0.3 mg/Kg). (b) La mayor dosis de FK-506 utilizada (0.3 mg/kg) disminuyó el incremento pancreático de la expresión de iNOS tras la exposición a FK-506 ($p < 0.05$ vs. grupo control; ** $p < 0.05$ vs grupo con LPS; # $p < 0.05$ vs. grupos con dosis de FK-506 a dosis de 0.07 y 0.15 mg/Kg; (c) Los niveles de eNOS hepáticos no variaron significativamente tras la inyección de LPS. La expresión de la isoforma mostró un aumento importante con la administración de FK-506 (* $p < 0.05$ vs. grupo control; ** $p < 0.05$ vs grupo estimulado con LPS) (d) La expresión pancreática de eNOS no fue alterada por la estimulación con LPS, pero se incrementó significativamente tras la administración de la dosis más alta de FK-506 (* $p < 0.05$ vs. el resto de grupos). (f) La expresión de nNOS in homogeneizados de tejido pancreático no se vio afectada por la estimulación de LPS pero sí se vio disminuida al aplicar la dosis más alta de FK-506 (* $p < 0.05$ vs. grupo con FK-506 a mg/Kg)

Figura 6

Mediadores inflamatorios (niveles plasmáticos)

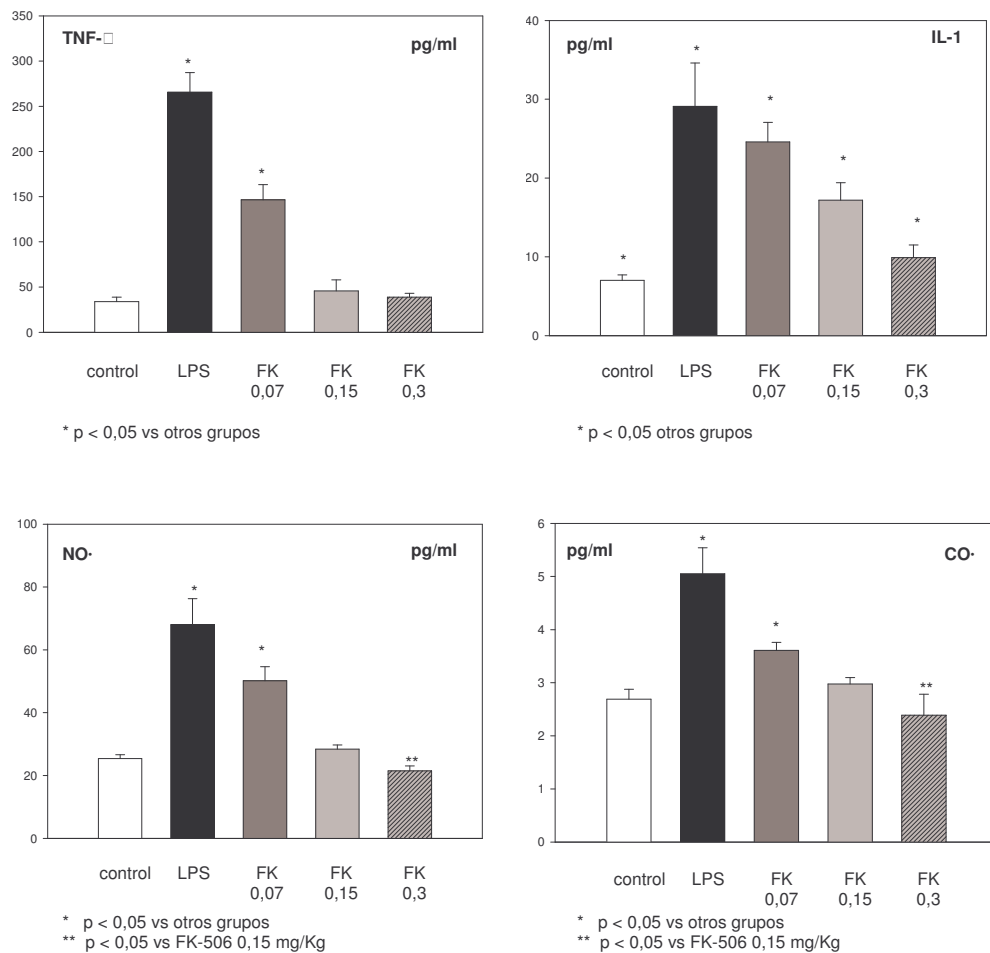


FIGURA 6. Modulación de la expresión plasmática de CO, NO, IL-1 y TNF- α tras la administración de FK-506, previa estimulación con LPS. El FK-506 disminuye la concentración de TNF- α , NO y CO tras el estímulo con LPS. La gráfica muestra los valores plasmáticos de TNF- α , IL-1, NO y CO (medias \pm SEM) en ratas Wistar tras la inoculación intraperitoneal de LPS (10 mg/Kg; Escherichia coli E5B55) en presencia o ausencia del FK-506 a dosis de 0.7, 0.15 y 0.3 mg/Kg. Cada barra indica los valores encontrados en al menos seis animales. (a y b) El incremento plasmático de TNF- α e IL-1 inducido por la estimulación con LPS mejorará en los animales tratados con FK-506 (* p <0.05 vs. el resto de grupos; test Kruskal-Wallis). (c y d) Los niveles de NO y CO aumentan significativamente en los roedores estimulados con LPS. El FK-506 producirá una disminución de este efecto en todos los grupos tratados (* p <0.05 vs. otros grupos; ** p <0.005 vs. grupo tratado con FK-506 a dosis de 0.15 mg/Kg; test de Kruskal Wallis para el modelo en que hemos medido el NO)

Discusión

Es conocido que tanto la generación de estrés oxidativo como el aumento en la producción y liberación sistémica de mediadores inflamatorios es un fenómeno común en la respuesta aguda inmune en situaciones de sepsis y shock séptico, lo cual tendrá como resultado un importante daño a nivel tisular (60). Se ha observado que tras la estimulación con LPS se produce un importante aumento en la producción de citocinas y NO tanto en tejido hepático como pancreático. Asimismo, tras la estimulación con LPS, se ha objetivado la activación de las isoformas de HO, de las cuales se considera que tendrán un efecto beneficioso, ya que disminuyen la liberación de radicales de estrés oxidativo, así como de los mediadores de respuesta inflamatoria. Se cree que el supuesto efecto anti-oxidante y antiinflamatorio del tacrólimus podría mejorar alguno de los eventos fisiopatológicos referidos. Este trabajo muestra un efecto protector y dosis dependiente del tacrólimus, modulando la producción de isoformas de HO y NOS, así como de mediadores inflamatorios, en el contexto de un modelo animal estimulado con LPS.

El rango de dosis de fármaco inmunosupresor con el que hemos tratado a nuestros animales hace que resulte difícil la comparación entre los resultados de este trabajo respecto a resultados previos sobre la evaluación de los efectos del tacrólimus. Existen publicaciones previas en las que ya se habían relacionado los tratamientos con dosis bajas de tacrólimus con mejores resultados clínicos en la atenuación de fenómenos fisiopatológicos deletéreos observados en el contexto de trasplante de islotes pancreáticos en humanos (61,62); lo que, por el contrario, no ha sido demostrado, es la relación de estas dosis de fármaco con el supuesto efecto antiinflamatorio del mismo. Si bien es cierto que con anterioridad se habían utilizado dosis similares, de 0.3 mg/Kg (63), sin embargo, las dosis empleadas en modelos de

daño hepático y pancreático, suelen ser mayores (64,65), administrando 10 mg/Kg/día para provocar la inhibición de la respuesta inmune inespecífica (66).

Respecto al efecto del tacrólimus frente a la expresión de iNOS, en nuestros experimentos se ha observado que se produce una disminución en la expresión de esta isoforma enzimática, mostrando una relación dosis-respuesta en ambos tejidos, tanto hepático como pancreático. Se sabe que la iNOS juega un papel fundamental en diferentes situaciones, que incluyen la isquemia-reperfusión, el trauma, el daño hepático producido por LPS así como el fallo multiorgánico en el contexto de sepsis o tras el trasplante (60,67). Si bien el efecto inhibitorio del tacrólimus en modelos de trasplante hepático en roedores y sobre hepatocitos estimulados con LPS ha sido descrito previamente, el mecanismo por el cual esto se produce no es bien conocido (68, 69, 70). La inhibición observada de iNOS e IL-1 en hepatocitos estimulados con LPS se ha relacionado con la activación del factor de transcripción Kappa-B (NF- κ B) (71). Esta propiedad es común a otros inmunosupresores, como la rapamicina (72) o el FK-330, habiéndose observado en modelos de isquemia-reperfusión tras el trasplante murino hepático (73).

Aunque es bien conocido que la expresión de iNOS en páncreas, secundaria a la exposición a citocinas (74) o hipoxia (75) es la responsable de algunos eventos deletéreos que ocurren en las células β pancreáticas, produciendo situaciones de daño y disfunción a dicho nivel, no existe conocimiento exhaustivo sobre el efecto de dicha isoenzima sobre el tejido pancreático total en presencia de un estímulo proinflamatorio. Existen estudios previos que han descrito la activación temprana de iNOS en modelos murinos de pancreatitis aguda (76), pero, sin embargo, no existían resultados publicados sobre los cambios en la expresión de la iNOS secundaria a la

exposición a LPS. Asimismo, se ha relacionado un efecto beneficioso en roedores transplantados de páncreas con el bloqueo de la iNOS cuando estos animales son tratados con aminoguanidina (77). Los resultados de nuestro trabajo muestran un efecto protector provocado por la inhibición de la expresión de iNOS por parte del tacrólimus cuando hemos usado la dosis mayor (0.3 mg/Kg), aunque el efecto de este fármaco sobre el tejido pancreático estimulado no está nada claro. Previamente, se había mostrado que dosis bajas de tacrólimus (5-10 ng/ml) podían disminuir la producción de NO, IL-1 e IF- γ en islotes pancreáticos estimulados (78), pero los efectos inmunosupresores en tejido pancreático completo afectan tanto a tejido endocrino como exocrino, células inmunes y tejido graso adyacente. La activación de NF- κ B previa a la transcripción de iNOS secundaria a la exposición de estímulos proinflamatorios y la activación de la vía p38 podrían estar envueltas en este proceso, pero estos fenómenos sólo han sido observados en islotes pancreáticos aislados, por lo que no es posible extrapolar esta información al tejido pancreático completo (73,79).

Hemos observado que no existen cambios en la expresión de la eNOS tras la estimulación de LPS en tejido hepático ni pancreático. Lo que sí que se ha visto es que la administración de tacrólimus produce un aumento de la isoenzima mencionada en ambos tejidos, especialmente cuando se usan las dosis mayores del mismo. La activación de eNOS en tejido hepático y pancreático no se considera una característica típica en situaciones de endotoxemia, pero la hipertensión portal puede aumentar esta expresión en modelos murinos (80). También se conoce que la expresión pancreática de eNOS está aumentada cuando existe un daño tisular extenso tras la inflamación aguda en modelos experimentales (81,82). La activación de eNOS inducida por mediadores inflamatorios puede llevar consigo la producción local excesiva de NO, lo

cual ha sido relacionado con la presencia de eventos deletéreos debidos a la activación de monocitos, células endoteliales y de Kupffer y tejido no acinar (82). A pesar del hecho de que se podrían estudiar modelos más específicos, nuestros resultados sugieren que el efecto del tacrólimus sobre la eNOS podría ser explicada por las modificaciones que se producen en el tejido conectivo e inmune y no por lo que ocurre en los hepatocitos, islotes pancreáticos o células acinares.

Respecto a la nNOS, hemos hallado un efecto divergente en la expresión de la misma tras la estimulación de tejido hepático y pancreático con LPS, ya que mientras que la nNOS hepática disminuye en presencia de LPS y tacrólimus, en tejido pancreático no se producen modificaciones en la expresión de esta isoforma enzimática. Lo que sí hemos observado es que la dosis mayor de tacrólimus disminuye los niveles de la isoenzima en tejido pancreático. Estos resultados difieren de lo descrito previamente en la literatura, mostrando que, a pesar del hecho de que los niveles de nNOS hipotalámicos e hipofisarios pueden verse alterados bajo el efecto del LPS, los niveles hepáticos no se verán modificados (83,84). Lo que es seguro es que, hoy por hoy, el efecto directo del tacrólimus en la expresión hepática de nNOS permanece apenas sin explicación en la literatura; y los resultados encontrados en nuestro modelo podrían deberse a mecanismos alternativos. El aumento en la expresión de nNOS ha sido observada en situaciones de fallo hepático y encefalopatía hepática (85), pero los cambios encontrados en relación a la endotoxemia no han sido todavía descritos. En este contexto, el descenso de nNOS inducido por la administración de nuestro fármaco a estudio en el hígado podría tener un efecto beneficioso en la insuficiencia hepática y en situaciones de respuesta inflamatoria inducida por LPS, como la peritonitis

bacteriana espontánea o las infecciones que aparecen tras el transplante de un órgano.

En el caso del páncreas, la nNOS se encuentra relacionada con la regulación de la vía de la secreción de la insulina a través de la regulación de las concentraciones de NO local y la actividad de la C-citocromo oxidasa (86); sin embargo, el papel que juega en los fenómenos patológicos inducidos por LPS permanece aún sin explicar. Debido a que el descenso de la actividad de la nNOS puede mejorar la secreción de insulina (87), cuando se administra tacrólimus, provocando una disminución en los niveles de esta isoenzima, parece que esto podría ayudar a optimizar el metabolismo glicémico en una situación de respuesta inflamatoria inducida por el LPS, según lo observado en nuestro trabajo. Aunque esto puede tener un efecto diabetógeno a largo plazo, los datos obtenidos coinciden con lo descrito previamente sobre islotes humanos estimulados con LPS (63). La producción de nNOS, además, contribuye a mejorar la vasodilatación esplácnica en el tracto digestivo superior (88) y la inhibición de la misma podría relacionarse con fenómenos de hipoperfusión local, lo cual es especialmente peligroso en cuadros de sepsis abdominal post-transplante.

Se considera que el nivel plasmático de NO es el resultado de la activación de todas las isoformas de NOS, pero, sin embargo, se ha observado que cuando se produce una situación de endotoxemia, la iNOS será la isoforma predominante y la principal causante de la producción de NO. En nuestro trabajo se midieron las concentraciones de nitrito y nitrato como parámetro indirecto de las concentraciones de NO. Es importante señalar, que el sistema empleado para la detección de nitrito y nitrato, y el hecho de no haber medido directamente las concentraciones de NO, podría verse influido por la dieta o alteraciones en el metabolismo de las

proteínas/nitrógeno. Con la finalidad de minimizar variaciones en este sentido, todos los animales utilizados fueron ratas Wistar facilitadas por el mismo proveedor, criadas y alimentadas bajo las mismas condiciones. El efecto del tacrólimus sobre la producción local de NO y sus niveles plasmáticos secundarios a la respuesta inflamatoria no han sido hasta ahora bien dilucidados. Nuestros resultados respecto a este punto, indican que el tacrólimus aminora la producción sistémica de NO tras la estimulación con LPS, habiéndose observado un patrón dosis-respuesta, dentro de un rango de dosis bajas. Como posible hipótesis se nos ocurre plantear que la modulación de la expresión enzimática que lleva a cabo el tacrólimus es más notable en la iNOS hepática. De esta forma, la mejoría en la producción hepática de NO podría ser un aspecto clave del efecto favorable de este inmunosupresor.

Nuestros hallazgos podrían ser explicados a partir de las diferencias en el efecto del tacrólimus sobre las distintas isoformas de NOS a través de la fosforilación de la misma. Existe literatura previa que ya hablaba del efecto protector del tacrólimus sobre las neuronas corticales cuando se produce una muerte inducida de las mismas a través del ácido N-metil-D-aspartico (NMDA), y que este efecto se produce precisamente por un aumento en la fosforilación de la NOS (89). Sin embargo, este efecto protector, durante la inflamación aguda o situaciones de isquemia reperusión, también puede ser debido a la modulación de la respuesta de células inmunes circundantes.

El efecto protector del tacrólimus, especialmente aquel relacionado con las modificaciones en la expresión de las isoformas de la NOS, puede ser explicado a partir de las FKBP. Existen FKBP de alto peso molecular con peptidilpropil-cis/trans-isomerasa (PPIasa) que pueden modificar la actividad de la calmodulina. Como ya

decíamos al principio, la nNOS y la eNOS son calmodulina-dependientes, no siendo así la isoforma inducible, que será calmodulina-independiente. En relación a nuestros resultados, la modulación de la calmodulina sólo podría explicar el efecto observado en la expresión de nNOS. El tacrólimus compartirá este efecto con otro inmunosupresor, que es la ciclosporina. Así como el complejo FK-506/FKBP, el complejo ciclosporina-ciclofilina inhibe la calcineurina y mejora tanto la actividad de la nNOS como la de la eNOS en situaciones de estrés, así como en situaciones de daño de médula espinal (90). Por otra parte, en nuestro trabajo se ha mostrado que existe una importante disminución en la expresión de iNOS tras la administración de tacrólimus, que podría deberse a mecanismos calmodulina-independientes. Esto podría estar relacionado con una interacción entre FKBP's pequeñas (sin capacidad de unión a calmodulina) o la actividad ejercida vía PPIasa mostrada en las FKBP's mayores (91). Otras inmunofilinas aglutinantes que no poseen una actividad significativa de unión a calmodulina, como pueden ser la rapamicina o la sangliferina pueden modificar igualmente los efectos adversos de la respuesta inflamatoria innata a través de mecanismos diferentes (92,93,94). El efecto protector del tacrólimus en fenómenos calmodulina-independientes podrían explicarse gracias a la activación de la ruta de señalización Akt-mTOR observada con rapamicina o con los supuestos mecanismos independientes de unión a inmunofilina postulados para la sangliferina. Sin embargo, la alta especificidad de esta molécula lleva a pensar que esta hipótesis es poco probable.

Respecto a la isoforma HO-1, observamos que se produce un aumento en la expresión de la misma tras la administración de LPS, tanto en tejido hepático como un pancreático, lo cual es un fenómeno común, ya objetivado en diferentes situaciones en las que se produce una respuesta innata a la inflamación (95). Sin embargo, los

posibles efectos del tacrólimus sobre esta isoenzima no han sido bien estudiados hasta el momento actual. Se ha visto que durante la respuesta inflamatoria aguda, desencadenada por diferentes motivos, como, por ejemplo, la exposición a LPS, la HO-1 ejerce un efecto protector sobre el tejido hepático (96). La HO-1 se expresa en macrófagos y células de Kupffer en situación basal, aunque tras la estimulación con LPS, los hepatocitos pueden producir también esta isoenzima (97), disminuyendo así los fenómenos inflamatorios intrahepáticos, basados en la infiltración leucocitaria y la liberación de IL-6, así como el aumento local de microvascularización y la producción de IL-10 (98,99). En cualquier caso, el efecto que el tacrólimus ejerce sobre la HO-1 permanece aún en duda. En nuestro trabajo hemos observado que el tacrólimus produce una disminución en la expresión de HO-1, dosis-dependiente, y esto podría traducirse en una mejoría de la teórica capacidad citoprotectora de esta isoenzima. Recientemente ha sido descrito que los depósitos intracelulares de hierro que se producen debido a la activación de la HO-1 durante el shock séptico darán lugar a daño hepático a través de la lesión mitocondrial; esto se opondría a lo expuesto anteriormente, ya que en este caso parece que el tacrólimus presentaría un efecto protector disminuyendo la expresión de HO-1 y, por tanto, este mecanismo de lesión intracelular (100). Por otra parte, la expresión aumentada de HO-1 en tejido pancreático que se ha visto en nuestro modelo, parece relacionada con la incapacidad para secretar insulina debido a la disminución masiva de NO (67). Por lo tanto, el bloqueo en la expresión de HO-1 inducido por el tacrólimus en el tejido pancreático podría disminuir el papel beneficioso que se le ha atribuido a la isoforma inducible de HO.

Se ha objetivado, que tras la exposición de tejido hepático o pancreático a LPS, la expresión de HO-2 aumenta de forma significativa. Desde un punto de vista teórico, la expresión de la isoforma constitutiva no debería sufrir modificaciones ante un estímulo pro-inflamatorio; sin embargo, existen datos previos que hablan tanto del aumento en tejido pancreático como de la disminución en tejido hepático de esta isoenzima en modelos de respuesta inflamatoria inespecífica (67,97). Siguiendo esta línea, nuestro estudio muestra que el tacrólimus produce una disminución de la expresión de esta isoforma sólo en tejido hepático. Hasta el momento actual, los efectos del tacrólimus sobre la HO-2 no han sido estudiados, ni en condiciones estándar ni en situaciones de respuesta inflamatoria. Es sabido que la forma inducible de la HO juega un papel clave en la defensa frente a diferentes agentes lesivos y estrés oxidativo, tanto en tejido hepático como pancreático; sin embargo, el papel de la HO-2 permanece aún poco claro (67). Los islotes pancreáticos presentan una importante actividad de la HO-2 cuando se comparan con células de otros órganos, como pueden ser los hepatocitos (101). Así, las diferencias observadas en la acción que el tacrólimus ejerce sobre la HO-2 podría venir explicada por las diferencias que se producen en la expresión de esta enzima entre tejido hepático y pancreático.

De acuerdo con los resultados encontrados al estudiar las isoformas de la HO, las concentraciones sistémicas de CO tras la estimulación con LPS disminuyeron cuando se administró tacrólimus, mostrando un comportamiento dosis-respuesta. Aunque se ha considerado que una concentración elevada de CO tenía efectos deletéreos, publicaciones recientes otorgan un papel protector al CO, produciendo éste una disminución de eventos relacionados con el estrés oxidativo, lo cual dependerá de su concentración y la situación patológica ante la cual nos encontremos

(102). En cualquier caso, los resultados deben ser interpretados cuidadosamente. La disminución en los niveles de CO inducida por el uso de tacrólimus puede llevarnos a concentraciones beneficiosas de este gas, favoreciendo los mecanismos fisiológicos antioxidantes durante la respuesta inflamatoria aguda, o disminuir estas concentraciones, inhibiendo estos efectos protectores del mismo.

Tanto en el caso de la IL-1 como del TNF- α , al administrar tacrólimus en nuestro estudio, observamos una disminución en la concentración de ambos mediadores, especialmente a la hora de estudiar homogeneizados de tejido hepático. Este efecto protector ya había sido previamente estudiado en modelos hepáticos estimulados con LPS, empleando para ello altas dosis de tacrólimus que disminuyeron tanto la activación como la aplicación de citocinas, a través de la disminución de TNF- α (68). Sin embargo, en este sentido, el efecto del tacrólimus encontrado sobre tejido pancreático, fue menor. La forma en la que el tacrólimus se distribuye en situaciones de endotoxemia en los diferentes tejidos no ha sido aclarada hasta el momento actual, pero parece probable que existan diferencias entre órganos debido a la alteración del flujo esplácnico en este tipo de situaciones. Es posible que el flujo pancreático durante situaciones de sepsis pueda ser menor que el que llega al tejido hepático, lo cual resultaría en que las concentraciones de inmunosupresor que se alcanzan en el páncreas también serían menores. De esta forma, este hecho podría explicar porqué el tacrólimus sería menos efectivo mejorando algunos de los efectos de la estimulación de LPS en homogeneizados pancreáticos en comparación con los hepáticos. La distribución por órganos de las concentraciones de LPS no ha sido medida en nuestro trabajo, pero es un hecho conocido que la administración de esta endotoxina puede aumentar la producción local de citocinas, incluyendo la IL-1 y el TNF- α , entre otras, y

que este fenómeno será especialmente intenso en el caso del páncreas endocrino. Aunque las células de Kupffer pueden secretar TNF- α , el hígado no es una de las fuentes principales de producción de este mediador durante la endotoxemia de origen peritoneal (52,103). Además, el aumento en la concentración de citocinas plasmáticas inducido por la exposición a LPS mejoró con la administración del fármaco inmunosupresor. El efecto protector del tacrólimus, haciendo disminuir las concentraciones de IL-1 y TNF- α , ya había sido descrito previamente en modelos murinos en los que se indujo una respuesta a LPS y modelos de isquemia-reperfusión (68,104). Por otra parte, este inhibidor de la calcineurina ha demostrado efectos beneficiosos en el fallo hepático secundario a isquemia intestinal del donante o tras la estimulación directa de células mononucleares circulantes (63, 105).

Un punto a tener en cuenta respecto a este trabajo sería preguntarnos sobre la aplicación clínica del estudio. ¿A qué pacientes irá dirigida esta terapia? El tacrólimus es un fármaco que, como ya veíamos, ha sido ampliamente estudiado y empleado en pacientes transplantados de diferentes órganos, para tratar o prevenir el rechazo (15). Por lo tanto, el uso del inmunosupresor con fines antiinflamatorios ante situaciones de sepsis por infecciones oportunistas en este grupo de pacientes, deberá ser tenido muy en cuenta. Sin embargo, las dosis utilizadas en este trabajo son mucho menores que las utilizadas en la práctica clínica habitual. Poniéndonos en una situación real, de un paciente tratado con tacrólimus a dosis inmunosupresoras, que en un momento dado desarrolla una infección, nos hace preguntarnos hasta qué punto resultan útiles las bajas dosis manejadas en este trabajo, ya que el paciente requerirá dosis mucho mayores de fármaco sólo por su situación de base. No obstante, el modelo de paciente transplantado, inmudeprimido, y con necesidad de FK-506, parece una diana más que

aceptable para el uso de esta terapia. Por otra parte, habría que tener en cuenta el resto de pacientes, es decir, aquellos sin indicación de uso de este fármaco y en los cuales se emplearía el tacrólimus sólo por su efecto antiinflamatorio en casos de sepsis. Como ya se ha descrito, este medicamento se está usando en la actualidad para otras finalidades diferentes a la inmunodepresión en pacientes transplantados, como enfermedades autoinmunes (18,19,20). En este caso sí que resultaría útil estudiar el uso del tacrólimus a bajas dosis como fármaco antiinflamatorio, ya que extrapolándolo a la práctica clínica habitual, podrían usarse dosis mucho más seguras con una considerable menor cantidad de efectos secundarios, por lo que su rango de aplicación sería mayor.

Además, nuestros resultados podrán servir de base a estudios sobre nuevos agentes terapéuticos y estrategias contra la respuesta inflamatoria aguda y la sepsis. Estudiando el efecto antiinflamatorio del tacrólimus, podríamos pensar en el uso de otros fármacos con similar mecanismo de acción. En primer lugar, cabe citar la ciclosporina. La ciclosporina A es un péptido cíclico compuesto por 11 aminoácidos, originalmente obtenido de un hongo denominado *Tolypocladium inflatum*, que, al igual que el FK-506, basa su mecanismo de acción en la inhibición de la producción de linfoquinas, incluida la IL-2, evitando así la diferenciación y la proliferación de los linfocitos T citotóxicos. La ciclosporina, como ya veíamos en el tacrólimus, bloquea la transcripción del gen que codifica la IL-2. Se une con una gran afinidad a una proteína citoplasmática en los linfocitos T, la ciclofilina. La única diferencia entre ambos fármacos es la potencia inmunosupresora, mayor en el caso del tacrólimus, entre 10 y 100 veces superior in vitro (106). El complejo fármaco-ciclofilina interaccionará con un tercer componente, la calcineurina. Esta unión produce la inhibición de su actividad

fosfatasa y de algunos procesos calciodependientes e interfiere en la activación de las células T y en la producción de linfocinas. La ciclosporina ha sido un fármaco utilizado clásicamente como profilaxis o tratamiento del rechazo en pacientes transplantados, dependiendo su rango terapéutico del tipo de transplante, del tiempo transcurrido y del tratamiento inmunosupresor concomitante.

Otros fármacos a tener en cuenta serán el sirolimus, también conocido como rapamicina, y el everolimus, derivado semisintético del anterior. Éstos actuarán al unirse a la misma inmunofilina que el FK-506, la FKBP12, pero no interaccionan con la calcineurina, sino con una proteína nuclear mTOR, encargada de regular el ciclo celular. Interferirán en fases tardías de la estimulación linfocitaria, impidiendo el paso de la fase celular G₁ a la fase S, bloqueando de esta forma la proliferación de linfocitos T y la síntesis de anticuerpos (107) así como la proliferación de células no hematopoyéticas. Se unen mayoritariamente a células sanguíneas, de manera que sólo un 8% circula en plasma unido a lipoproteínas o como fármaco libre. La eliminación depende del citocromo P450, fundamentalmente de la isoenzima CYP3A4 de la que son sustrato, pudiendo verse implicados en diferentes interacciones con fármacos inhibidores o inductores de esta isoenzima, al igual que los inhibidores de la calcineurina, y con las mismas repercusiones clínicas. La ciclosporina inhibe el metabolismo del sirolimus y del everolimus y da lugar a un incremento de las concentraciones de los inhibidores de la mTOR (108). La larga semivida de eliminación de estos fármacos permite una única administración diaria; en el caso del sirolimus incluso se ha postulado la necesidad de administrar una dosis de choque. Las diferencias en el mecanismo de acción explican los perfiles de toxicidad tan distintos respecto a los inhibidores de la calcineurina, con los que comparten otras

características, como las farmacocinéticas. En vista de lo anterior descrito, sería interesante, desarrollar estudios dirigidos a estos fármacos y el papel que pueden desempeñar como antiinflamatorios en situaciones de respuesta inflamatoria inespecífica, como la sepsis y el shock séptico.

En 1999, Stanley A. Nasraway, especialista estadounidense en Medicina Interna e Intensiva, enunciaba su frase lapidaria "*We must change course*" (109), refiriéndose a las diferentes terapias empleadas como tratamiento coadyuvante en la sepsis y el shock séptico y el fracaso de las mismas, tendencia que se ha perpetuado hasta hoy en día. Como ya veíamos al principio, se han empleado multitud de tratamientos: anticuerpos antiendotoxina, anticuerpos monoclonales anti-TNF, pentoxifilina, inhibidores de la proteincinasa, antagonistas del tromboxano, etc; los cuales se han ido desestimando a lo largo del tiempo por su falta de eficacia, incluso por su efecto perjudicial (45,46,110). De aquí radica la importancia de este trabajo. Ante una patología con una importante morbi-mortalidad, con múltiples fracasos en el tratamiento, dejamos una puerta abierta respecto al tacrólimus como fármaco antiinflamatorio, aún por terminar de definir y estudiar, pero con una futura, y posiblemente relevante, aplicación en situaciones de sepsis y shock séptico.

Conclusiones

1. De manera global, observamos que el tacrólimus aminora determinados fenómenos en relación con la respuesta inflamatoria inespecífica asociados a la estimulación con LPS, mostrando en ocasiones un patrón “dosis-respuesta”. Si comparamos qué ocurre en hígado y páncreas, se objetiva un modelo “dosis-respuesta” más uniforme en el caso del hígado, siendo la respuesta del páncreas más errática respecto a este fármaco. Teniendo en cuenta las dosis de tacrólimus utilizadas en este trabajo en comparación con las que se emplean en la práctica clínica habitual, se observa un efecto protector de las mismas, de modo que podría tener una aplicación diferente en el contexto de pacientes que sufran situaciones en las que predomine la R.I.I.
2. La administración de LPS por vía intraperitoneal genera una sobreexpresión de los mediadores de inflamación estudiados TNF- α e IL-1 y de las isoformas enzimáticas HO-1, HO-2 e iNOS; fenómeno que, aplicado a situaciones clínicas reales, se corresponderán con alteraciones fisiopatológicas potencialmente graves en las que, a menudo, predomina la R.I.I.
3. Tras la administración de FK-506 a dosis bajas, observamos una disminución en las concentraciones de los mediadores de inflamación estudiados, IL-1 y TNF- α . Estos hallazgos son coherentes con lo contrastado en la literatura existente.
4. Cuando se ha estudiado el efecto del FK-506 sobre las concentraciones de las diferentes isoformas de HO y de NOS, en general se ha visto que el inmunosupresor produce una disminución en la concentración de las mismas,

la cual seguirá, en términos generales un patrón “dosis-respuesta”. Un fenómeno paradójico a tener en cuenta será la disminución de HO-1 tras la administración de tacrólimus, a la cual se adjudica efecto antiinflamatorio y antioxidante, hecho que parece aún más relevante en tejido pancreático que hepático, reforzando la idea de la respuesta más errática que realiza el páncreas respecto al hígado.

5. Tras la estimulación de tejido hepático y pancreático con LPS, se produce un aumento en las concentraciones plasmáticas de NO y CO, así como una disminución en las concentraciones de los mismos tras la administración de tacrólimus, todo ello coherente con los resultados esperados y con el supuesto efecto antioxidante y antiinflamatorio del tacrólimus.
6. Así, dando respuesta a la hipótesis inicial, podemos concluir que el tacrólimus sí parece tener un efecto protector en situaciones de respuesta inflamatoria inespecífica, el cual vendrá mediado por una disminución de la aparición de estrés oxidativo y de mediadores inflamatorios inespecíficos.

Bibliografía

- 1- Kim IK, Bedi DS, Denecke C, Ge X, Tullius SG. Impact of innate and adaptive immunity on rejection and tolerance. *Transplantation* 2008 Oct 15;86(7):889-94.
- 2- Gill R, Tsung A, Billiar T. Linking oxidative stress to inflammation: Toll-like receptors. *Free Radic Biol Med* 2010 May 1;48(9):1121-32. Epub 2010 Jan 18.
- 3- Henningsson R, Alm P, Lundquist I. Evaluation of islet heme oxygenase-CO and nitric oxide synthase-NO pathways during acute endotoxemia. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001 May;280(5):C1242-54.
- 4- Diesen DL, Kuo PC. Nitric Oxide and Redox Regulation in the Liver: Part II. Redox Biology in Pathologic Hepatocytes and Implications for Intervention. *J Surg Res* 2009 Oct 27.
- 5- Grotz MR, Deitch EA, Ding J, Xu D, Huang Q, Regel G. Intestinal cytokine response after gut ischemia: role of gut barrier failure. *Ann Surg* 1999;229:478-86.
- 6- Jirillo E, Caccavo D, Magrone T, Piccigallo E, Amati L, Lembo A et al. The role of the liver in the response to LPS: experimental and clinical findings. *J Endotoxin Res* 2002;8(5):319-27.
- 7- Wang X, Wu L, Wu K, Zhang R, Dong Y. Roles of endotoxin-related signaling molecules in the progression of acute necrotizing pancreatitis in mice. *Pancreas* 2005 Oct;31(3):251-7.
- 8- Haglund U. The splanchnic organs as the source of toxic mediators in shock. *Prog Clin Biol Res* 1988;264:135-45.
- 9- Rubin RH. The direct and indirect effects of infection in liver transplantation: Pathogenesis, impact, and clinical management. *Curr Clin Top Infect Dis* 2002;22:125–154.

- 10- Al-Hasan MN, Razonable RR, Eckel-Passow JE, Baddour LM. Incidence rate and outcome of Gram-negative bloodstream infection in solid organ transplant recipients. *Am J Transplant* 2009 Apr;9(4):835-43.
- 11- St Peter SD, Moss AA, Mulligan DC. Effects of tacrolimus on ischemia-reperfusion injury. *Liver Transpl* 2003 Feb;9(2):105-16.
- 12- Hackert T, Pfeil D, Hartwig W, Fritz S, Gebhard MM, Klar E et al. Ciclosporin aggravates tissue damage in ischemia reperfusion-induced acute pancreatitis. *Pancreas* 2006 Mar;32(2):145-51.
- 13- Arias-Díaz J, Ildefonso JA, Muñoz JJ, Zapata A, Jiménez E. Both tacrolimus and sirolimus decrease Th1/Th2 ratio, and increase regulatory T lymphocytes in the liver after ischemia/reperfusion. *Lab Invest* 2009 Apr;89(4):433-45.
- 14- Abderrazek JA. Tratamiento inmunosupresor de la Miastenia Gravis con Tacrolimus (FK506). [Tesis Doctoral]. Barcelona; 2006.
- 15- Ficha técnica de Prograf®. En: [//www.vademecum.es/medicamento-prograf_4776](http://www.vademecum.es/medicamento-prograf_4776)
- 16- Balibrea del Castillo JM. Estudio del rechazo primario en el trasplante de islotes pancreáticos. [Tesis Doctoral]. Madrid; 2005.
- 17- Sánchez Atrio A, Álvarez-Mon M. Fármacos Inmunomoduladores. En Velázquez. *Farmacología Básica y Clínica*. 17ª ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2004. p 549-561.
- 18- Ficha técnica de Protopic®. En: [//www.aemps.es/actividad/alertas/usoHumano/seguridad/elidel-rizan-protopic.htm](http://www.aemps.es/actividad/alertas/usoHumano/seguridad/elidel-rizan-protopic.htm)
- 19- Torre Morin F de la. Tacrolimus en las blefarconjuntivitis graves. *Alergia, Asma e Inmunología Pediátricas*. Vol 17, Num 2. May-Aug 2008: 70-73.

- 20- Kremmer JM, Habros JS, Kolba KS, Kaine JL, Borton MA, Mengle-Gaw Laurel J et al. Tacrolimus in Rheumatoid Arthritis Patients Receiving Concomitant Methotrexate. *Arthritis & Rheumatism*. Vol 48, No 10, October 2003: 2763-2768.
- 21- Pascual C, Fleischer AB. Tacrolimus Ointment (Protopic®) for Atopic Dermatitis. *Skin Therapy Lett* 2004 Nov; 9(9): 1-5.
- 22- Grunwald MH, Ben Amitai BD, Amichai B. Macrolactam immunomodulators (tacrolimus and pimecrolimus): new horizons in the topical treatment of inflammatory skin diseases. *J Dermatol* 2004 Aug, 31(8): 592-602.
- 23- Sakuna S, kato Y, Nishigaki F, Sasakawa T, Magari K, Miyata S et al. FK506 potently inhibits T cell activation induced TNF- α and IL-1 β production in vitro by human peripheral blood mononuclear cells. *Br J Pharmacol* 2000; 130: 1655-1663.
- 24- Horigone A, Hirano T, Oka K. Tacrolimus-induced apoptosis and its prevention by interleukins in mitogen-activated human peripheral-blood mononuclear cells. *Immunopharmacology*. 1998 Mar;39(1):21-30.
- 25- Fink MP. Función de las citocinas como mediadoras de la respuesta inflamatoria. En: Sabiston. *Tratado de Cirugía*. 17ª ed. Madrid: Elsevier España S. A; 2005 (Vol 1): p 45-66
- 26- Geissmann F, Manz MG, Junq S, Sieweke MH, Merad M, Ley K. Development of monocytes, macrophages and dendritic cells. *Science* 2010 Feb 5;327(5966):656-61.
- 27- Regueiro González JR, López Larrea C, González Rodríguez S, Martínez Naves E. Células y tejidos del sistema inmune. Señalización. En: Regueiro González JR, López Larrea C, González Rodríguez S, Martínez Naves E. *Inmunología. Biología y patología del sistema inmune*. 3ª ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2003: p 9-21.

- 28- Dinarello CA. IL-1: Discoveries, controversies and future directions. *Eur J Immunol* 2010 Mar; 40(3): 599-606.
- 29- Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol* 2009 ;27 :519-50. Review.
- 30- Rojas Campos N. El lipopolisacárido bacteriano: una potente endotoxina con múltiples actividades biológicas. Recientes avances en estructura, genética y bioquímica. *Rev costarric cienc méd Set* 1995 16(3): 71-84.
- 31- Bermejo A, Duarte J. Mechanisms of transduction of lipopolysaccharide. *Ars Pharmaceutica* 2003; 44(2): 121-139.
- 32- Venereo Gutiérrez JR. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Rev Cubana Med Milit* 2002; 31(2): 126-133.
- 33- Circu ML, Aw TY. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic Biol Med* 2010 Mar 15;48(6):749-62. Epub 2010 Jan 4. Review.
- 34- Ferrer Viant D, Jorge Fonseca C, García Rodríguez RE, Martínez Anglada PF. Óxido nítrico. Importancia biológica y participación de algunas funciones cardiovasculares y hematológicas. *MEDISAN* 1998 2(3): 45-53.
- 35- Nahrevanian H. Involvement of nitric oxide and its up/down stream molecules in the immunity against parasitic infections. *Braz J Infect Dis* 2009 Dec ;13(6):440-8.
- 36- Kanwar JR, kanwar RK, Burrow H, Baratchi S. Recent advances on the roles of NO in cancer and chronic inflammatory disorders. *Curr Med Chem* 2009;16(19):2373-94. Review.
- 37- Kmiec Z. Cooperation of liver cells in health and disease. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 2001;161:III-XIII,1-151.

- 38- Ryter SW, Choi AM. Heme oxygenase-1/carbon monoxide:from metabolism to molecular therapy. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2009 Sep;41(3):251-60. Epub 2009 Jul 17. Review.
- 39- Sánchez C, Rodeiro I, Garrido G, Delgado R. Hemo-Oxigenasa 1: Un promisorio Blanco Terapéutico. *Acta Farm. Bonarense* 24 (4): 619-26 (2005).
- 40- Johnson WT, DeMars LCS. Increased Heme Oxygenase-1 Expression during Copper Deficiency in Rats Results from Increased Mitochondrial Generation of Hydrogen Peroxide. *J. Nutr* June 2004 134: 1328-1333.
- 41- Zeng Z, Huang HF, Chen MQ, Zhang YJ. Heme oxygenase-1 protects donor livers from ischemia/reperfusion injury: The role of Kupffer cells. *World J Gastroenterol* 2010 March 14; 16(10):1285-1292.
- 42- Munford RS. Septicemia grave y choque séptico. En: Harrison. Principios de Medicina Interna. 17ª ed. Madrid: McGraw-Hill-Interamericana; 2009 (Vol 2): p 1773-1780
- 43- Cornell TT, Wynn J, Shanley TP, Wheeler DS, Wong HR. Mechanism and regulation of the gene expression response to sepsis. *Pediatrics*. 2010 June; 125(6): 1248-1258. doi:10.15422/peds.2009-3274
- 44- Alam HB. Advances in resuscitation strategies. *Int J Surg*. 2011 ; 9(1): 5-12. doi :10.1016/j.ijsu.2019.09.001
- 45- Hirasawa H, Oda S, Nakamura M. Blood glucose control in patients with severe sepsis and septic shock. *World J Gastroenterol* 2009 September 7;15(33):4132-4136
- 46- Aneja R, Carcillo J. Differences between adult and pediatric septic shock. *Minerva Anesthesiol* 2011 Oct;77(10):986-92

- 47- Martí Carvajal AJ, Solà I, Lathyris D, Cardona AF. Human recombinant activated protein C for severe sepsis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2011 Apr 13;(4):CD004388
- 48- Zakim D, Boyer TD. *Diagnosis and Management of Chronic Forms of Liver disease*. En: Zakim D, Boyer TD. *Hepatology. A Textbook of Liver Disease*. 4ª ed. Philadelphia: Saunders; 2000: p 1127-1162
- 49- Tribl B, Bateman RM, Milkovich S, Sibbald WJ, Ellis CG. Effect of nitric oxide on capillary hemodynamics and cell injury in the pancreas during *Pseudomonas pneumonia*-induced sepsis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286:H340-H345, 2004
- 50- Bonior J, Jaworek J, Kot M, Konturek SJ, Pawlik WW. Endotoxemia in the infant rats modulates HSP60 protein level in the pancreatic acinar cells. *J Physiol Pharmacol*. 2007 Aug ;58 Suppl 3:189-98
- 51- Pezzilli R, Barassi A, Imbrogno A, Fabbri D, Pigna A, Morselli-Labate AM, Corinaldesi R, Eril GM. Is the pancreas affected in patients with septic shock?—a prospective study. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, Vol 10, No 2
- 52- Giroir BP, Johnson JH, Brown T, Allen GL, Beutler B. The Tissue Distribution of Tumor Necrosis Factor Biosynthesis during Endotoxemia. *J Clin Invest*. 1992 Sep;90(3):693-8
- 53- Keklikoglu N, et al. Inducible nitric oxide synthase immunoreactivity in healthy rat pancreas. *Folia Histochem Cytobiol*. 2008;46(2):213-7
- 54- Burnette WN. Western blotting: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polycrarnyde gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 1981 Apr;112(2):195-203

- 55- Regueiro González JR, López Larrea C, González Rodríguez S, Martínez Naves E. Evaluación de la inmunidad. Señalización. En: Regueiro González JR, López Larrea C, González Rodríguez S, Martínez Naves E. Inmunología. Biología y patología del sistema inmune. 3ª ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2003: p 195-202
- 56- Amersham ECL PlusTM Western Blotting Detection Reagents. En: [//www.gelifesciences.com/aptrix/upp01077.nsf/Content/Products?OpenDocument&moduleId=46854](http://www.gelifesciences.com/aptrix/upp01077.nsf/Content/Products?OpenDocument&moduleId=46854)
- 57- Bradford, MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976;72:248-54
- 58- SDS-PAGE Gel Electrophoresis. En: [//www.molecularstation.com/sds-page-gel-electrophoresis](http://www.molecularstation.com/sds-page-gel-electrophoresis)
- 59- Tsikas D. Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: appraisal of the Griess reaction in the L-arginine/nitric oxide area of research. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2007 May 15;851(1-2):51-70
- 60- Landry DW, Oliver JA. The pathogenesis of vasodilatory shock. N. Engl. J. Med. 345 (2001):588-595
- 61- Ryan EA, Paty BW, Senior PA, Bigam D, Alfadhli E, Kneterman NM et al. Five-year follow-up after clinical islet transplantation. Diabetes. 2005;54:2060-2069
- 62- Balibrea del Castillo JM, García-Martin MC, Arias-Díaz J, Giné E, Vara E, Balibrea Cantero JL. Antiapoptotic effect of tacrolimus on cytokine-challenged human islet. Cell Transplant. 2009;18:1237-1246
- 63- Oltean M, Zhu C, Mera S, Pullerits R, Mattsby-Baltzer I, Mölne J et al. Reduced liver injury and cytokine release after transplantation of preconditionated intestines. J Surg Res. 2009; 154:30-37

- 64- Hackert T, Pfeil D, Hartwig W, Fritz S, Gebhard MM, Klar E et al. Cyclosporin aggravates tissue damage in ischemia reperfusion-induced acute pancreatitis. *Pancreas*. 2006;32:145-161
- 65- Uchida K, Sakaida K, Hironaka K, Kayano K, Okita K. Preventive effect of FK 506 (tacrolimus hydrate) on experimentally induced acute liver injury in rats. *Dig. Dis. Sci*. 2000;45: 1996-2001
- 66- Asano K, Taki M, Matsuo S. Mode of action of FK-506 on protective immunity to *Hymenolepis* in mice. *In vivo* 1996;10(6):537-545
- 67- Henningsson R, Alm P, Lundquist I. Evaluation of islet heme oxygenase-CO and nitric oxide synthase-NO pathways during acute endotoxemia. *Am J Physiol. Cell Physiol*. 2001;280:1242-1254
- 68- Kaibori M, Okumura T, Ito S, Oda M, Inoue T, Kamiyama Y. Inhibition of iNOS induction by FK506, but not by cyclosporine, in rat hepatocytes. *Transplant Proc*. 1999;31:804-805
- 69- Wang GY, Meng W, Ji B, Du XH, Zhao J. Expression of inducible nitric oxide synthase in transplanted rat liver and its inhibitory effect. *Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int*. 2005;4:360-363
- 70- Farghali H, Canová N, Kucera T, Martinek J, Masek K. Nitric oxide synthase inhibitors modulate lipopolysaccharide-induced hepatocyte injury: dissociation between in vivo and in vitro effects. *Int. Immunopharmacol*. 2003;3:1627-1638
- 71- Kaibori M, Sakitani K, Oda M, Kamiyama Y, Masu Y, Nishizawa M et al. Immunosuppressant FK506 inhibits inducible nitric oxide synthase gene expression at a step of NF-kappaB activation in rat hepatocytes. *J Hepatol*. 1999; 30: 1138-1145

- 72- Tuñón MJ, Sánchez-Campos S, Gutiérrez B, Culebras JM, González-Gallego J. Effects of FK506 and rapamycin on generation of reactive oxygen species, nitric oxide production and nuclear factor kappa B activation in rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol.* 2003;66: 439-445
- 73- Tsuchihashi S, Kaldas F, Chida N, Sudo Y, Tamura K, Zhai Y et al. FK330, a novel inducible nitric oxide synthase inhibitor, prevents ischemia and reperfusion injury in rat liver transplantation. *Am J Transplant.* 2006;6:2013-2022
- 74- Eizrik DL, Flodström M, Karlsen AE, Welsh N. The harmony of the spheres: inducible nitric oxide synthase and related genes in pancreatic beta cells. *Diabetologia* 1996;39:875-890
- 75- Ko SH, Ryu GR, Kim S, Ahn YB, Yoon KH, Kaneto H et al. Inducible nitric oxide synthase-nitric oxide plays an important role in acute and severe hypoxic injury to pancreatic beta cells. *Transplantation.* 2008;85:323-330
- 76- Ang AD, Adhikari S, Ng SW, Bhatia M. Expression of nitric oxide synthase isoforms and nitric oxide production in acute pancreatitis and associated lung injury. *Pancreatology.* 2009;9:875-890
- 77- Li BF, Liu YF, Cheng Y, Zhang KZ, Li TM, Zhao N. Protective effect of inducible nitric oxide synthase inhibitor on pancreas transplantation in rats. *World J Gastroenterol.* 2007;13:6066-6071
- 78- Balibrea del Castillo JM, Arias-Díaz J, García-Martín MC, Vives-Pi M, García Pérez JC, Cantero Cid R, Vara Ameigeiras E, Balibera Cantero JL. Cytoprotective effect of low-dose tacrolimus on islets of Langerhans in cultures subjected to stimulation by acute rejection cytokines. *Cir Esp.* 2010;87:484-493

- 79- Matsuda T, Omori K, Vuong T, Pascual M, Valiente L, Ferreri K et al. Inhibition of p38 pathway suppresses human islet production of proinflammatory cytokines and improves islet graft function. *Am J Transplant*. 2005;5:484-493
- 80- Stumm MM, Orazio D, Sumanovski, Martín PY, Reichen J, Sieber CC. Endothelial, but not the inducible, nitric oxide synthase is detectable in normal and portal hypertensive rats. *Liver*. 2002;22:441-450
- 81- Sugiyama Y, Kato S, Mitsufuji S, Okanoue T, Takeuchi K. Pathogenic role of endothelial nitric oxide synthase (eNOS/NOS-III) in cerulein-induced rat acute pancreatitis. *Dig Dis Sci*. 2006;5:1396-1403
- 82- DiMagno MJ, Williams JA, Hao Y, Ernst SA, Owyang C. Endothelial nitric oxide synthase is protective in the initiation of cerulein-induced acute pancreatitis in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2004;287:G80-87
- 83- Satta MA, Jacobs RA, Kaltsas GA, Grossman AB. Endotoxin induces interleukin-1 β and nitric oxide synthase mRNA in rat hypothalamus and pituitary. *Neuroendocrinology*. 1998;67:109-116
- 84- Jacobs RA, Satta MA, Dahia PL, Chew SL, Grossman AB. Induction of nitric oxide synthase and interleukin-1 β , but not heme oxygenase, messenger RNA in rat brain following peripheral administration of endotoxin. *Brain Res Mol Brain Res*. 1997;49:238-246
- 85- Butterworth RF. Neurotransmitter dysfunction in hepatic encephalopathy: new approaches and new findings. *Metab Brain Dis*. 2001;16:55-65
- 86- Lajoix AD, Reggio H, Chardès T, Péraldi-Roux S, Tribillac F, Roye M et al. A neuronal isoform of nitric oxide synthase expressed in pancreatic beta-cell controls insulin secretion. *Diabetes* 2001;50:1311-1323

- 87-Lajoix AD, Badiou S, Péraldi-Roux S, Chardès T, Dietz S, Aknim C et al. Protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase (PIN) is a new regulator of glucose-induced insulin secretion. *Diabetes*. 2001;55:3279-3288
- 88- Jansson L, Carlsson PO, Bodin B, Andersson A, Källskog O, Neuronal nitric oxide synthase and splanchnic blood flow in anaesthetized rats. *Acta Physiol Scand*. 2005;183:257-262
- 89- Kaminska B, Gaweda-Walerych K, Zawadzka M. Molecular mechanisms of neuroprotective action of immunosuppressants-facts and hypotheses. *J Cell Mol Med*. 2004;8:45-48
- 90- Díaz Ruiz A, Vergara P, Pérez-Severiano F, Segovia J, Guizar-Sahagún G, Ibarra A et al. Cyclosporin-A inhibits constitutive nitric oxide synthase activity and neuronal and nitric oxide synthase expressions after espinal cord injury in rats. *Neurochem Res*. 2005;30:245-251
- 91- Kang CB, Dhe-Paganon S, Yoo HS. FKBP family proteins: immunophilins with versatile biological functions. *Neurosignals*. 2008; 16:318-325
- 92- Baker AK, Wang R, Mackman N, Luyendyk J, Rapamycin enhances LPS induction of tissue factor and tumor necrosis factor- α expression in macrophages by reducing IL-10 expression. *Mol Immunol*. 2009;46:2249-2255
- 93- Arias-Diaz J, Ildefonso JA, Muñoz JJ, Zapata A, Jiménez E. Both tacrolimus and sirolimus decrease Th1/Th2 ratio, and increase regulatory T lymphocytes in the liver after ischemia/reperfusion. *Lab Invest*. 2009;89:433-445
- 94- Härtel C, Iblher P, Puzik A, Worteimeier K, Ebel B, Schultz C et al. Immunosuppressive activity of the immunophilin-binding drug sanglifehrin A in human

whole blood: potent inhibition of interleukin-6 produced by lymphocytes and monocytes. *Scand J Immunol.* 2006;63:26-34

95- Soares MP, Marguti I, Cunha A, Larsen R. Immunoregulatory effects of HO-1: how does it work? *Curr Opin Pharmacol.* 2009;9:482-489

96- Wen T, Wu ZM, Liu Y, Tan YF, Ren F, Wu H. Upregulation of heme oxygenase-1 with hemin prevents D-galactosamina and lipopolysaccharide-induced acute hepatic injury in rats. *Toxicology.* 2007; 237: 184-193

97- Bauer I, Wanner GA, Rensing H, Alte C, Miescher EA, Wolf B et al. Expression pattern of heme oxygenase isoenzymes 1 and 2 in normal and stress-exposed rat liver. *Hepatology.* 1998;27:829-938

98- Roller J, Laschke MW, Scheuer C, Menger MD. Heme oxygenase (HO)-1 protects from lipopolysaccharide (LPS)-mediated liver injury by inhibition of hepatic leukocyte accumulation and improvement of microvascular perfusion. *Langenbecks Arch Surg.* 2010;395:387-394

99- Kamimoto M, Mizuno S, Nakamura T. Reciprocal regulation of IL-6 and IL-10 balance by HGF via recruitment of heme oxygenase-1 in macrophages for attenuation of liver injury in a mouse model of endotoxemia. *Int J Mol. Med.* 2009;24:161-170

100- Duvigneau JC, Piskernik C, Haindl, Kloesch B, Hartl RT, Hüttemann M et al. A novel endotoxin-induced pathway: upregulation of heme oxygenase 1, accumulation of free iron, and free iron-mediated mitochondrial dysfunction. *Lab Invest.* 2008;88:70-77

101- Alm P, Ekström P, Henningsson R, Lundquist I. Morphological evidence for the existence of nitric oxide and carbon monoxide pathways in the rat islets of Langerhans: and immunocytochemical and confocal microscopic study. *Diabetologia.* 1999;42:978-986

- 102- Bauer I, Pannen BH. Bench-to-bedside review: carbon monoxide-from mitochondrial poisoning to therapeutic use. *Crit Care*. 2009;13:220
- 103- U. Haglund. The splanchnic organs as the resource of toxic mediators in shock. *Prog Clin Biol. Res*. 1998;264:135-145
- 104- García-Criado FJ, Palma-Vargas JM, Valdunciel-García JJ, Toledo AH, Misawa K, Gómez-Alonso A et al. Tacrolimus (FK506) down-regulates free radical tissue levels, serum cytokines, and neutrophil infiltration after severe liver ischemia. *Transplantation*. 1997;64:594-598
- 105- Sakuma S, Kato Y, Nishigaki F, Sasakawa T, Magari K, Miyata S, Ohkubo Y, Goto T. FK506 potently inhibits T cell activation induced TNF-alpha and IL-1 beta production in vitro by human peripheral blood monocuclear cells. *Br J Pharmacol*. 2000 ;130 :1655-1663
- 106- Peters DH, Fitton A, Plosker GL, Faneds D. Tacrolimus: a review of its pharmacology, and therapeutic potential in hepatic and renal transplantation. *Drugs*. 1993;46:746-794
- 107- Vilella-Bach M, Nuzzi P, Fang Y, Chen J. The FKBP12-rapamycin-binding domain is required for FKBP12-rapamycin-associated protein kinase activity and G1 progression. *J Biol Chem*. 1999;274:4266-4272
- 108- Kovarik JM, Kalbag J, Figuereido J, Rouilly M, Frazier OL, Rodorf C. Differential influence of two cyclosporine formulations on everolimus pharmacokinetics: a clinically relevant pharmacokinetic interaction. *J Clin Pharmacol*. 2002 ;42:95-99
- 109- Nasraway S. Sepsis research: we must change course. *Crit Care Med*. 1999;27(2):427-430

110- Duran Giménez-Rico HJ, Aller Reyro MA, Lorente Ruigómez L, Durán Jiménez-Rico L, Arias Pérez J, Durán Sacristán H. Sepsis y shock séptico: un torbellino de mediadores inflamatorios de difícil manejo terapéutico. An Med Interna, 2002 Jan;19(1):35-43